

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV KYSELINY HYALURONOVÉ NA KOROZI  
HOŘČÍKOVÉ SLITINY AZ31

EFFECT OF HYALURONIC ACID ON THE CORROSION OF AZ31 MAGNESIUM ALLOY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michaela Holubářová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Leoš Doskočil, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1610/2020  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Michaela Holubářová**  
Studijní program: Spotřební chemie  
Studijní obor: Spotřební chemie  
Vedoucí práce: **Ing. Leoš Doskočil, Ph.D.**  
Akademický rok: 2020/21

### Název diplomové práce:

Vliv kyseliny hyaluronové na korozi hořčíkové slitiny AZ31

### Zadání diplomové práce:

1. Základní rešerše koroze hořčíku a jeho slitin v simulovaných tělesných tekutinách s ohledem na jejich využití v medicíně.
2. Rešerše vlivu hyaluronové kyseliny na korozi kovových materiálů v simulovaných tělesných tekutinách.
3. Na základě literární rešerše navrhnout a realizovat experimenty.
4. Zjistit vliv hyaluronové kyseliny na korozi hořčíkové slitiny AZ31 využitím především elektrochemických metod.
5. Charakterizace korozních produktů.

### Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.  
Toto zadání je součástí bakalářské práce.

---

Bc. Michaela Holubářová  
student(ka)

---

Ing. Leoš Doskočil, Ph.D.  
vedoucí práce

---

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

---

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.

děkan

V Brně dne 1.2.2021

## **ABSTRAKT**

Hořčík a jeho slitiny jsou zajímavé materiály díky řadě svých fyzikálních vlastností. Mají značný potenciál zvláště v medicínských aplikacích, kde mohou sloužit jako materiál pro výrobu ortopedických a kardiovaskulárních implantátů.

Nevýhodou těchto materiálů je jejich citlivost ke korozi. V důsledku toho je potřeba znát korozní vlastnosti hořčíku a jeho slitin v kontaktu s látkami, které se vyskytují v lidském těle.

Hyaluronan je polysacharid, který je přirozeně přítomen v lidském těle a může interagovat s implantáty.

Tato diplomová práce se zabývá vlivem nízkomolekulárního (80–130 kDa) a vysokomolekulárního (1 500–1 750 kDa) hyaluronanu na korozní vlastnosti hořčíkové slitiny AZ31 v prostředí dvou simulovaných fyziologických roztoků (0,9 % NaCl a synoviální tekutina). Metody potenciodynamická polarizace (PD) a elektrická impedanční spektroskopie (EIS) byly využity pro elektrochemické testy. Povrchová analýza byla provedena pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) a rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM), aby se odhalilo chemické složení korozních produktů a morfologie povrchu po korozi.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Koroze, hořčíková slitina AZ31, hyaluronan, simulovaný fyziologický roztok

## **ABSTRACT**

Magnesium and its alloys are interesting materials due to their many physical properties. They have considerable potential, especially in medical applications, where they can serve as a material for the production of orthopedic and cardiovascular implants.

The disadvantage of these materials is their sensitivity to corrosion. As a result, it is necessary to know the corrosive properties of magnesium and its alloys in contact with substances that occur in the human body.

Hyaluronan is a polysaccharide that is naturally present in the human body and can interact with implants.

This master's thesis deals with the influence of low molecular weight (80–130 kDa) and high molecular weight (1 500–1 750 kDa) hyaluronan on the corrosion properties of magnesium alloy AZ31 in the environment of two simulated physiological solutions (0,9 % NaCl and synovial fluid). Potentiodynamic polarization (PD) and electrical impedance spectroscopy (EIS) were used for electrochemical tests. Surface analysis was performed using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and scanning electron microscopy (SEM) to reveal the chemical composition of the corrosion products and the surface morphology after corrosion.

## **KEYWORDS**

Corrosion, magnesium alloy AZ31, hyaluronan, simulated physiological solution

HOLUBÁŘOVÁ, Michaela. *Vliv hyaluronové kyseliny na korozi hořčíkové slitiny AZ31* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-05-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/130739>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Leoš Doskočil.

## ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně odcitovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala Ing. Leoši Doskočilovi, Ph.D., vedoucímu své diplomové práce, za veškerou jeho pomoc (a že jí bylo), milý přístup, věnovaný čas, ochotu a odborné rady, které mi v průběhu zpracování diplomové práce předal.

## OBSAH

1	Úvod .....	8
2	Teoretická část .....	9
2.1	Implantáty.....	9
2.1.1	Kovové implantáty .....	9
2.1.2	Implantáty z hořčíku a jeho slitin.....	11
2.2	Materiály pro zhotovení implantátů na bázi hořčíku .....	13
2.2.1	Hořčíkové slitiny .....	13
2.3	Degradace hořčíku a jeho slitin.....	15
2.3.1	Koroze Mg.....	15
2.3.2	In vivo, in vitro .....	17
2.3.3	Simulovaný fyziologický roztok .....	17
2.4	Hyaluronan.....	19
2.4.1	Základní popis hyaluronanu .....	19
2.4.2	Výskyt hyaluronanu.....	20
2.4.3	Chování hyaluronanu v roztoku .....	20
2.5	Současné poznatky o vlivu hyaluronamu na korozi v biomedicínských aplikacích .	22
3	Cíle.....	24
4	Experimentální část .....	25
4.1	Použitý materiál a roztoky .....	25
4.1.1	Materiál a jeho příprava.....	25
4.1.2	Roztoky a jejich příprava.....	25
4.2	Použité metody a přístroje.....	25
4.2.1	Elektrochemické korozní testy .....	25
4.2.2	Charakterizace povrchu SEM-EDS .....	26
4.2.3	XPS analýza korozních produktů.....	26
5	Výsledky a diskuze .....	27
5.1	Potenciodynamická polarizace.....	27
5.2	Elektrochemická impedanční spektroskopie.....	30
5.2.1	Prostředí NaCl.....	30
5.2.2	Prostředí SST.....	35
5.3	XPS analýza korozních produktů .....	39

5.4	SEM.....	41
6	Závěr.....	43
7	Seznam použitých zdrojů.....	45
8	Seznam používaných zkratk a symbolů .....	51

# 1 ÚVOD

Komerčně dostupné ortopedické materiály (titan, nerezová ocel...) nejsou biologicky odbouratelné a mají mnohem vyšší hodnoty některých mechanických vlastností (pevnost, tvrdost...) než kosti. Pomalá korozní rychlost těchto materiálů může vést k různým negativním dopadům, jako jsou např. záněty tkání a alergické reakce. A jelikož se tyto kovové implantáty v lidském těle spontánně nerozkládají, je třeba provést další chirurgický zákrok pro jejich vyjmutí.

Vhodnější variantou je použití biologicky odbouratelných kovů. Zde se nabízí hořčík, jelikož má přirozenou schopnost biologického rozkladu. Tím je možné zabránit druhému chirurgickému zákroku. Překážkou je jeho příliš vysoká rychlost koroze ve fyziologickém prostředí. Ovšem k vylepšení se dá využít hořčíkových slitin s vhodně zvolenými legujícími prvky nebo příprava povlaků na jejich povrchu.

V dřívějších studiích bylo poznamenáno, že přítomnost lubrikantu v synoviální složce významně mění korozní chování slitin konvenčních materiálů. Hyaluronan je negativně nabitý lineární polysacharid tvořící kovalentní strukturu, která se skládá z  $\beta$ -D-glukuronové kyseliny a N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminu. Hyaluronan je důležitou složkou mezibuněčné hmoty a synoviální tekutiny kloubu. Dále poskytuje vhodné prostředí pro růst buněk a je zapojen do různých biologických funkcí.

Hyaluronan existuje ve více formách. V této práci je použit nízkomolekulární a vysokomolekulární. Každý má své specifické vlastnosti, které se mohou promítnout na rychlosti koroze materiálů, se kterými je hyaluronan v kontaktu.

Literatura se ovšem zabývá především vlivem hyaluronanu na korozi implantátů z nedegradabilních kovů, jako je ocel, nebo slitiny titanu. Poznatky o dopadu hyaluronanu na korozní chování hořčíku a jeho slitin schází. Proto se tato práce zabývá vlivem hyaluronanu na korozi hořčíkové slitiny AZ31 ve fyziologickém prostředí.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Implantáty

Materiály, které urychlují hojení zlomenin a napomáhají regeneraci kostí, mají obrovský potenciál pro použití v ortopedii [1]. Dočasné ortopedické zdravotnické prostředky jako jsou čepy, šrouby, tyče a dlahy se obecně používají k zajištění zlomenin kostí [2]. Představují důležitou třídu materiálů pro náhradu tvrdých tkání [3].

Implantát je zdravotnický prostředek, který se vkládá do těla člověka/živočicha, a využívá se za účelem nahrazení chybějící biologické struktury, podpory poškozené struktury nebo zlepšení stávající struktury [4].

Tyto biomateriály jsou používány v různých částech lidského těla, například jako umělé ventily v srdci, stenty v krevních cévách, rekonstrukce močových cest, nebo náhradní implantáty pro ramena, kolena, kyčle, kolena atd. [5].

Aby se implantáty daly použít ve fyziologickém prostředí, je třeba prokázat jejich vynikající biokompatibilitu, dobré mechanické vlastnosti, vynikající odolnost proti korozi a vysokou odolnost proti únavě [4].

Implantáty jsou široce používány jako ortopedické, kardiovaskulární a v některých případech i orální [4].

Aplikace implantátů se liší v závislosti na různých požadavcích. Požadavkem může být například hojení a stabilizace zlomených kostí pomocí šroubů, tyčí a dlah. Dále se může jednat o nápravu deformit, jako je abnormální zakřivení páteře, nebo zlepšení funkce orgánů [4].

#### 2.1.1 Kovové implantáty

Archeologické nálezy starověkých lidských koster ukazují, že k použití kovových implantátů docházelo již před několika tisíci lety [6].

K výrobě ortopedických a kardiovaskulárních implantátů se obvykle používají inertní kovy jako je titan, nerezová ocel a slitiny kobaltu a chromu, a to díky jejich vynikajícím vlastnostem jako jsou – odolnost vůči korozi, biokompatibilita a odpovídající mechanické vlastnosti [6].

Volba materiálu je důležitá pro výrobu implantátu, neboť nevhodný materiál může způsobit, že tělo implantát nepřijme a může dojít k jeho selhání a zároveň ublížení na zdraví pacienta [5].

**Titan** a jeho slitiny se považují za slibné materiály pro implantáty pro náhradu kostí. Titan má nízkou hustotu ( $4,5 \text{ g/cm}^3$ ), vhodný modul pružnosti (105–116 GPa), významnou odolnost proti korozi, a také je biokompatibilní a netoxický v prostředí lidského těla [1].

Nejrozšířenější **ocel** pro medicínské použití je ocel typu 316L. Díky vysokému obsahu Cr, který vytváří na povrchu pasivační vrstvu, se tato ocel vyznačuje jako korozivzdorná [7].

Slitiny na bázi Co-Cr korodují pomaleji ve srovnání s nerezovou ocelí a jsou odolnější v prostředí bohatém na chloridy. Je to kvůli tvorbě pasivní vrstvy  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  v prostředí lidského těla [1]. Slitina Co-Cr-Mo je jedna z nejdůležitějších slitin používaných v ortopedii kvůli nižší ceně v porovnání s jinými implantáty na bázi titanu. Většinou se používá v jednoduchých roztocích anorganických solí [8].

#### **2.1.1.1 Nevýhody kovových implantátů**

Komerčně dostupné ortopedické materiály nejsou biologicky odbouratelné a mají mnohem vyšší hodnoty některých mechanických vlastností (např. pevnost, tvrdost, pružnost) než kosti [1]. Přispívají k různým negativním účinkům, jako jsou např. záněty lokálních tkání a alergické reakce v důsledku potenciálního uvolňování cytotoxických iontů [1,4]. K dalším záporům patří tzv. „stress shielding“, který je způsobený kovovými implantáty, jejichž moduly pružnosti jsou vyšší než moduly pružnosti přirozené lidské kosti. Stress shielding nastává tehdy, pokud implantát nese větší zátěž než sousední kostní tkáň, což v konečném důsledku vede ke ztrátě hustoty kosti, nebo snížení růstu nových kostí [1].

Jelikož se tyto kovové implantáty (dlahy, šrouby a dráty) v lidském těle spontánně nerozkládají, je třeba provést druhý chirurgický zákrok pro jejich vyjmutí a s tím související nezbytná další léčba. Opakované operace zvyšují nejen náklady, ale představují i zátěž pro pacienty a lékařský personál [3].

Tekutiny reagují s kovovými implantáty a mohou uvolňovat kovové ionty v těle. Uvolnění kovových iontů, jako jsou  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  a  $\text{Cr}^{6+}$ , může vyvolat nežádoucí reakce v těle a způsobit vážná zdravotní rizika [4].

Nerezová **ocel** je ve fyziologickém prostředí náchylná ke korozi kvůli přítomnosti významného množství chloridů v lidském těle. Degradací oceli mohou vzniknout a akumulovat se zánětlivé částice hydroxidu železa ve tkáních. Přesto se nerezová ocel běžně používá pro výrobu implantátů kvůli její ekonomické dostupnosti [1].

Krom toho další legující prvky, jako např. **nikl**, může vyvolat toxické účinky nebo alergické reakce a způsobit tak v organismu řadu nepříznivých reakcí. V krajním případě může dojít až k odmítnutí implantátu [9].

#### **2.1.1.2 Řešení problémů kovových implantátů**

Implantát z inertního materiálu umožňuje obnovit funkci tkáně, ale zůstává trvale na svém místě, což může vést k nežádoucím důsledkům, jak bylo uvedeno výše [6]. To vedlo k hledání alternativ v podobě biologicky rozložitelných biomateriálů, které by postupně degradovaly v těle až do doby zhojení tkáně [1].

Je třeba používat biologicky odbouratelné kovy s lepšími mechanickými vlastnostmi, výbornou biokompatibilitou, bez biotoxicity a s vhodnými degradačními vlastnostmi s ohledem na rychlost hojení tkání [10].

Rozložitelné implantáty mají výhodu úplného hojení tkání s obnovením funkce [6]. Ve skutečnosti se během procesu hojení mechanická tuhost/síla dočasných implantátů pomalu snižuje, zatímco okolní tkáň znovu získává pevnost. Neškodná degradace materiálu

implantátu eliminuje potřebu druhého chirurgického zákroku, který se běžně provádí za účelem odstranění implantátu, jakmile se tkáň zcela uzdraví [4].

Polymery a kovy jsou dvě třídy materiálů, které jsou intenzivně zkoumány pro přípravu biologicky odbouratelných implantátů v lidském těle [4].

Z kovových materiálů má zvláštní potenciál v tomto směru hořčík a jeho slitiny [3]. Jejich klady jsou popsány v následující kapitole.

### **2.1.2 Implantáty z hořčíku a jeho slitin**

Klinická aplikace biologicky odbouratelných materiálů na bázi Mg je hmatatelnou vizí v dočasných ortopedických implantátech [1]. V posledních letech jsou komerčně dostupné první hřeby (Magnezix, Milagro) vyrobené z hořčíkových slitin, které jsou úspěšně aplikovány do těla [11]. Hořčík a jeho slitiny mají přirozenou schopnost biologického rozkladu a je tak zabráněno druhému chirurgickému zákroku. Dále vykazují vynikající biokompatibilitu a nebyly dosud zaznamenány žádné kritické toxické limity nebo vedlejší účinky [1,4]. Díky své vysoké pevnosti, tažnosti a dobré odolnosti vůči korozi jsou materiály na bázi Mg vhodné k výrobě dočasných implantátů [3].

Mg<sup>2+</sup> ionty, které se uvolňují během implantace a degradace, jsou součástí běžného metabolismu [1]. Nadbytečné množství Mg<sup>2+</sup> iontů je vylučováno z lidského těla močí [6].

Mg<sup>2+</sup> ionty jsou čtvrtým nejdostupnějším kationem v lidském těle. Ve zdravém těle člověka o hmotnosti 70 kg je uloženo 25–35 g Mg. Více než polovina celkového fyziologického hořčíku je přítomna v lidských kostech. Přibližně 35–40 % celkového Mg se nachází v měkkých tkáních, následovaných krevním sérem. Kromě toho se Mg také účastní více než 300 enzymatických a adenosintrifosfátových reakcí v lidském těle. Hořčík je nezbytný pro lidský metabolismus jako kofaktor mnoha enzymů a je dobře známo, že ionty hořčíku usnadňují hojení tkání [1].

Modul pružnosti hořčíku (40–45 GPa) lépe odpovídá hodnotě přírodní kosti (3–20 GPa) ve srovnání s běžnými kovovými materiály, jako je nerezová ocel (200 GPa), slitiny na bázi kobaltu (230 GPa) nebo slitiny na bázi titanu (115 GPa) [10]. Stejně tak hustota hořčíku (1,74–2,0 g/cm<sup>3</sup>) odpovídá hustotě kosti (1,79 g/cm<sup>3</sup>) [10,12]. Jelikož jsou mechanické vlastnosti podobné přírodní kosti, mohou se významně snížit problémy ortopedických implantátů spojené s výskytem stress shielding [4].

#### **2.1.2.1 Nevýhody hořčíkových implantátů**

Hlavní překážkou klinického použití hořčíku a jeho slitin je dán jejich příliš vysokou rychlostí koroze ve fyziologickém prostředí (pH 7,2–7,4), které krom anorganických minerálů obsahuje také rozpuštěný kyslík, bílkoviny a chloridové a vodíkové ionty [10]. Tím materiál ztrácí mechanickou integritu a tkáň tak nemá dostatek času na uzdravení [3].

Elektrochemická reakce zahrnuje tvorbu vrstev hydroxidu hořečnatého a uvolňování vodíku (H<sub>2</sub>). Mg(OH)<sub>2</sub> působí jako dočasná ochranná vrstva [1], neboť není stabilní zvláště za přítomnosti chloridových iontů v tekutině lidského těla. Přítomnost chloridových iontů

rychle převádí vrstvu hydroxidu na vysoce rozpustný chlorid hořečnatý. Zmizení hydroxidové vrstvy v důsledku chloridových iontů urychluje korozi slitin hořčíku [4].

Navíc rychlá koroze hořčíku je spojena i s uvolňováním plynného vodíku ( $H_2$ ). Vodíkové bubliny se mohou hromadit v plynových kapsách v blízkosti implantátu. To může oddálit hojení a vést k nekróze tkání [10].

Rozpouštění hořčíku také vyvolává alkalizaci (zvýšení pH) poblíž povrchu implantátu [10].

To může nepříznivě ovlivnit fyziologické prostředí a vést k nevratným změnám struktury proteinů [10,13].

Z těchto důvodů jsou zapotřebí biokompatibilní implantáty na bázi hořčíku, které si zachovají svou mechanickou integritu po celou dobu reparativní fáze (4–16 týdnů) v závislosti na konfiguraci a umístění zlomeniny, stavu přilehlých měkkých tkání a vlastnostech pacienta (věk, zdravotní stav, souběžná zranění/nemoci) [10].

#### **2.1.2.2 Řešení rychlé degradace**

Úprava povrchu je jedním z nejúčinnějších způsobů nejen ke snížení a kontrole degradačního chování, ale také ke zlepšení povrchové biokompatibility hořčíku. Povrchové modifikace poskytují vynikající zlepšení korozních vlastností implantátů ze slitiny hořčíku [10].

Ke zlepšení korozní odolnosti slitin hořčíku mohou být použity různé strategie jako např. aplikace povlaků, povrchové úpravy implantátů, nebo legování [4].

Korozní odolnost hořčíku a jeho slitin významně zlepšují různé typy povlaků, včetně polymerních, grafenových a vápenato-fosfátových povlaků. Biokompatibilita a dobré bariérové vlastnosti jsou klíčovými kritérii, které musí povlak splňovat, aby mohly být slitiny hořčíku použity jako implantáty [4].

Vápník a fosfor jsou dva hlavní prvky přítomné v kostních minerálech. Povrchová modifikace slitin hořčíku pomocí Ca-P povlaků tedy může potenciálně zlepšit biokompatibilitu potažených implantátů. Dále jsou široce používány silanové povlaky, a to ke zlepšení korozní odolnosti různých slitin hořčíku v různých korozních prostředích [4].

Ke zlepšení korozní odolnosti se také používají aplikace konverzních povlaků, jako jsou biologicky odbouratelné polymery, včetně kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu. Odolnost vůči korozi se zvyšuje s rostoucí tloušťkou povlaku, zatímco adheze povlaku se při tom snižuje [4].

Ke zpomalení rychlosti degradace Mg se využívá také legování kovovými prvky [1]. Použitím vhodných legujících prvků lze zvýšit mechanickou pevnost a korozní odolnost slitin hořčíku. Hlavním problémem je cytotoxicita a dlouhodobé zánětlivé důsledky těchto prvků. Legující prvky je třeba vybírat pečlivě, aby byla zachována biokompatibilita, protože během degradace budou také rozpuštěny v tělní tekutině [10]. Hořčík lze legovat například zinkem, vápníkem nebo hliníkem. Kromě toho se nyní do oblasti ortopedických implantátů zavádějí hořčíkové kompozity [1].

## 2.2 Materiály pro zhotovení implantátů na bázi hořčíku

Hořčík byl zkoumán jako alternativa materiálu pro odbouratelné implantáty. Do této skupiny se zařadil hlavně díky svým vlastnostem jako je biodegradace a biokompatibilita [14].

### 2.2.1 Hořčíkové slitiny

Dříve byl Mg používán ve své čisté kovové formě, kde se nacházel přibližně v 99,9 %, a zbytek bylo malé množství nečistot. Použitím čisté kovové formy Mg nejsou poskytnuty nejlepší mechanické vlastnosti, ani dostatečná korozní odolnost požadovaná pro použití v implantátech. Vhodnějším řešením se jeví použití slitin [15].

Používání slitin je běžnou technikou k vylepšení vlastností různých materiálů vhodnou volbou legujících prvků [14].

Jedno z nejdůležitějších kritérií pro výběr prvků ve slitině Mg je spojeno s její toxicitou a rozpouštěním. Z tohoto důvodu je třeba pečlivě vybírat přidané prvky a jejich koncentraci, aby nedošlo k překročení přípustných hodnot pro tělo v toxickém rozmezí a eliminaci způsobu vylučování. Prvky jako vápník, mangan, zinek a cín jsou přítomny v celém lidském těle a jsou dobrou volbou pro bioabsorbovatelné implantáty. Naproti tomu slitiny, které obsahují prvky jako beryllium, barium, olovo, kadmium a thorium, jsou toxické. Jiné prvky jako hliník, bismut, lithium, stříbro, stroncium a zirkonium lze použít pouze v nízkých dávkách [15].

Nejběžnější slitinové prvky zabudované do Mg jsou Al, Zn, Mn, Ca a prvky vzácných zemin. Použití prvků, jako jsou prvky vzácných zemin a Al, je však velmi kontroverzní z důvodu značných zdravotních rizik, pokud dojde k překročení přípustných koncentrací, viz níže [15].

**Hliník** je nejběžnější legovací prvek hořčíkových slitin a jeho koncentrace se pohybuje mezi 2 a 9 hmotnostními procenty. Mg je legován Al, aby se zvýšila jak pevnost, tak odolnost vůči korozi. Spolu se zlepšenou pevností této slitiny také vykazují velmi dobrou slévateľnost. Obsah Al v Mg přímo ovlivňuje rychlost koroze slitiny a zvýšení obsahu Al obvykle vede k nižší rychlosti koroze [14].

Existuje několik studií, které prokázaly krátkodobou kompatibilitu Mg-Al slitiny, ale neexistuje žádná, která by prokázala dlouhodobou biokompatibilitu [14]. Al je také spojován s neurologickými poruchami, které mohou vést k demenci či Alzheimerově chorobě [6].

Přidání jiných prvků může zlepšit některé vlastnosti Mg-Al slitiny. Přidání **vápníku** ke slitině zvýší tepelnou stabilitu, což vede ke zlepšení meze kluzu a odolnosti proti tečení. Obsah kritických kontaminujících nečistot musí být udržován pod tolerančním limitem, aby nedošlo k zahájení elektrochemické reakce [14].

**Zinek** je nezbytným esenciálním stopovým prvkem v lidském těle. Podílí se na metabolismu kostí a funkci imunitního systému. Většina obsahu Zn v lidském těle se nachází ve svalech a kostní tkáni. Zinek, jako legující prvek, se přidává do hořčíkových slitin pro zlepšení pevnosti při běžné pokojové teplotě. Při dávce Zn by slitina s obsahem Al 7–10 hm. %

neměla překročit 1 hm. %. Při změně teploty by docházelo k vnitřnímu pnutí a k tvorbě mikropórů. Při vyšších koncentracích existuje podezření na neurotoxické účinky [16].

**Křemík** ve slitinách hořčíku vede k tvorbě fáze  $Mg_2Si$ , který se vyznačuje nízkou měrnou hmotností, vysokou tvrdostí a nízkou teplotní roztažností [17]. Vyloučením této fáze dochází ke zpevnění slitiny bez ovlivnění korozních vlastností [18]. Největší výhodou těchto kovů je vysoká teplota tání ( $1\,085\,^{\circ}C$ ) [17].

**Mangan** se v lidském těle vyskytuje jako základní stopový prvek, který se uplatňuje při enzymových reakcích. Dále ovlivňuje funkci imunitního systému, růst kostí a srážení krve. Mangan zvyšuje korozní odolnost tak, že ve slitinách Mg-Al a Mg-Al-Zn váže Fe a těžké kovy na stabilní sloučeniny, a tím potlačí jejich škodlivý vliv způsobující korozi. Nadměrný obsah Mn může vést ke vzniku neurologických poruch a může způsobit vážnou cytotoxicitu [19].

Tabulka 1, 2 a 3 shrnují nejčastěji používané hořčíkové slitiny a jejich složení [15].

*Tabulka 1: Přehled a složení hořčíkových slitin s hliníkem jako legujícím prvkem [15]*

Slitina	Mg [%]	Al [%]	Zn [%]	Si [%]	Mn [%]	Cu [%]	Fe [%]	Be [%]
AZ31	96	2,5-3,5	1,3	0,05	0,2	-	-	-
AZ61	93	6	0,5	0,04	0,15	0,003	0,007	-
AZ91	90,8	8,25	0,63	0,035	0,22	0,003	0,014	0,002
AM60	93,5	6	0,1	-	0,35	-	-	-

*Tabulka 2: Přehled a složení hořčíkových slitin se zinkem jako legujícím prvkem [15]*

Slitina	Mg [%]	Zn [%]	Zr [%]
ZK30	96,4	3	0,6
ZK60	93	6	1

*Tabulka 3: Přehled a složení hořčíkových slitin s prvky vzácných zemin jako legujícími prvky [15]*

Slitina	Mg [%]	Y [%]	Nd [%]	Zr [%]	Li [%]	Al [%]	RE [%]
WE43	93,6	4	2,25	0,16	-	-	-
LAE442	90	-	-	-	4	4	2

Slitiny **Mg-Al-Zn** (= hořčíkové slitiny AZ) tvoří hlavní skupinu běžně používaných hořčíkových slitin pro tváření s obsahem hliníku od 3 do 9 hm. % a zinku do 1,5 hm. %. Slitiny jsou dobře tvárné a svařitelné, jsou však málo odolné vůči korozi. Slitiny mají dobré mechanické vlastnosti, vysokou pevnost a značnou houževnatost [20].

Použitelnost Mg-Al-Zn slitin za vyšších teplot je omezená. Slitina se používá např. při výrobě bloků motorů, žebříků, stojanů, atd. [20].

### 2.2.1.1 Slitina AZ31

Komerční hořčiková slitina AZ31 má dobré mechanické a plastické vlastnosti. Používá se k obrábění, svařování, tváření, i na odlitky. Tepelně se nezpracovává, protože není vytvrditelná [21].

Slitiny AZ31 jsou díky přidanému hliníku relativně pevné. Zinek se do slitiny přidává kvůli dalšímu zvýšení pevnosti. Hliník ve slitině společně s manganem zvyšuje napětí na mezi kluzu. Zinek, hliník i mangan celkově zlepšují korozivzdornost [22].

Na slitině AZ31 byla zkoumána koroze a biologická bezpečnost stentů zavedených do králíků. 1, 3 a 6 měsíců po implantaci bylo prováděno CT skenování (computed tomography = počítačová tomografie), stent byl odstraněn z těla a podroben analýze délky a hmotnosti. Po jednom měsíci implantace si stent zachoval svůj tvar a velikost. Po třech měsících stent již degradoval a ztratil většinu své hmotnosti. Po šesti měsících stent úplně degradoval a byl pozorován pouze jeho zbytek. Studie dospěla k závěru o biologické bezpečnosti stentu AZ31, ale poukázala na potřebu zlepšit odolnost proti korozi [14].

V jiné studii byly porovnávány kostní šrouby z čistého hořčíku a ze slitiny AZ31 opět implantací do králíků. V obou případech byla pozorována nová tvorba kostí. Po čtyřech týdnech vykazovaly šrouby z čistého hořčíku známky degradace a po osmi a dvanácti týdnech došlo k degradaci hlavních částí šroubů. Na druhé straně šrouby slitiny AZ31 nevykazovaly téměř žádné známky degradace po čtyřech týdnech a drobné známky degradace se projevíly po osmém a dvanáctém týdnu. V této studii se potvrdilo, že slitina AZ31 má daleko větší odolnost vůči korozi, než samotný čistý hořčík [14].

## 2.3 Degradace hořčíku a jeho slitin

### 2.3.1 Koroze Mg

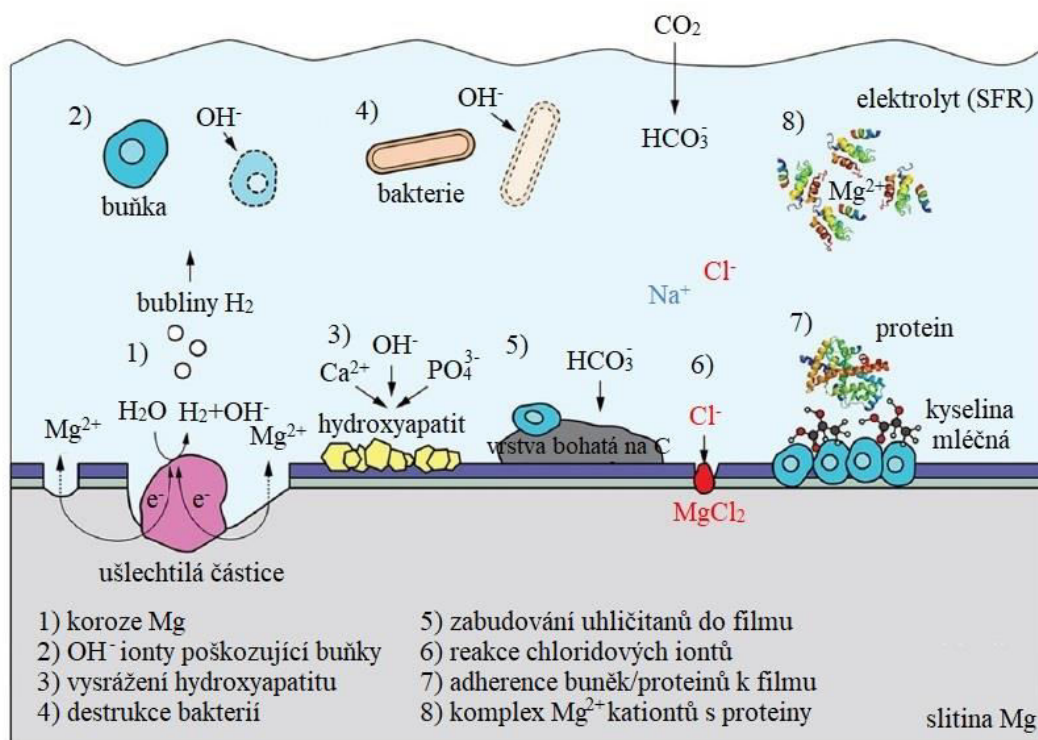
Vnitřní reaktivita Mg je vysoká, takže má vysokou tendenci ke korozi ve vodných roztocích. Navíc korozní produkty Mg obvykle poskytují malou ochranu proti korozi ve vodných roztocích [23].

Počáteční rychlost koroze slitin hořčíku je často příliš vysoká a vysoce reaktivní povrch slitiny hořčíku může být škodlivý pro biologické prostředí. Silné probublávání vodíku probíhá, pokud je vzorek holé slitiny Mg zaveden do jakéhokoli typu tělní tekutiny. V kombinaci s tím lze pozorovat lokální alkalizaci v blízkosti povrchu. Množství koroze Mg je přímo korelováno s množstvím vyvíjeného plynného vodíku [13].

Slitiny hořčíku mají obvykle rychlost koroze podstatně vyšší než u vysoce čistého Mg. Je to proto, že slitiny Mg obsahují matici  $\alpha$ -Mg, jednu nebo více dalších fází, a mohou obsahovat fáze spojené s prvky nečistot (Fe, Ni, Cu a Co). Tyto další fáze urychlují korozi  $\alpha$ -Mg matrice mikro-galvanickou korozí a obvykle způsobují značné rychlosti koroze. Limity nečistot závisí také na koncentraci dalších legujících prvků [23].

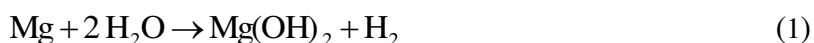
Korozní prostředí lidského těla sestává z roztoku 0,14 M NaCl s malým množstvím jiných anorganických látek, jako je  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  a  $\text{HCO}_3^-$ . Přítomnost chloridových iontů obvykle

vede ke zrychlené korozi, zatímco fosforečnany a uhličitany mohou podporovat tvorbu ochranných (nebo částečně ochranných) vrstev korozního produktu. Tělesná teplota 37 °C může poněkud urychlit korozní reakce ve srovnání s pokojovou teplotou. Normální pH krve je 7,4. Kromě různých anorganických složek tělních tekutin může přítomnost organických složek, jako jsou proteiny, buňky nebo bakterie, dále ovlivňovat korozní reakce. Tyto faktory způsobují různé interakce s korodujícím povrchem slitiny Mg. Některé z těchto interakcí jsou shrnuty na obrázku 1 [13].

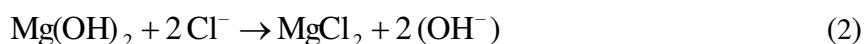


Obrázek 1: Faktory způsobující interakce s hořčíkovou slitinou [13]

Biodegradace hořčíku v těle lze popsat následující reakcí (rovnice (1)) [10]:



Rozpustný film hydroxidu hořečnatého vytváří mírně účinnou ochrannou vrstvu na povrchu hořčíku, která zabraňuje další korozi ve vodě. Pokud však korozivní médium obsahuje chloridy s koncentracemi nad 30 mmol/l, hydroxid hořečnatý se převádí na chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>), viz rovnice (2) [10]:



Ve fyziologickém prostředí jsou přítomny vysoké koncentrace chloridů v rozmezí 150 mmol/l, což vede k produkci vysoce rozpustného chloridu hořečnatého, který neposkytuje účinnou ochranu před další korozi. Uvolňování hydroxidových iontů z hydroxidu hořečnatého



při reakci s ionty chloru vede k lokálnímu zvýšení hodnoty pH v blízkosti hostitelské tkáně [10].

Kromě iontů chloru obsahuje tělní tekutina ionty vápníku a fosforečnanu, které spouští produkci sloučenin  $Mg_xCa_y(PO_4)_z(OH)_n$ , jako je fosforečnan vápenatý a/nebo fosforečnan hořečnato-vápenatý. Tyto komplexní bioaktivní minerální produkty vytvářejí na povrchu hořčíku depoziční vrstvu a inhibují další korozi a zvyšování hodnoty pH [10].

Kromě různých anorganických složek obsahují tělní tekutiny organické složky, jako jsou biomolekuly, proteiny, buňky nebo dokonce bakterie, které se mohou adsorbovat nebo ulpívat na povrchu hořčíku a tím ovlivňovat chování při rozpouštění. Přítomnost bílkovin a jiných organických produktů v krvi způsobuje vytvoření ochranného povlaku kolem implantátů hořčíku zpomalujících korozi. Proteiny s rychlostí rozpouštění hořčíku se mohou časem měnit, takže mohou nejprve inhibovat a později urychlit degradaci. Produkty degradace silně ovlivňují následné kroky degradace na jeho povrchu, jakož i biologickou reakci kostní tkáně [10].

Předpovědi degradace jsou obtížné, protože nejen prostředí implantátu se mění u každého člověka jinak, ale také se může měnit v čase. Proces degradace začíná velmi vysokou rychlostí a zpomaluje se zvyšující se dobou ponoření. Hořčikové implantáty podléhají značnému mechanickému zatížení, když jsou vystaveny tělním tekutinám v důsledku chůze, běhu a jiných pohybů těla [10].

### **2.3.2 In vivo, in vitro**

V současné době je k dispozici omezené množství údajů o chování slitin hořčíku in vivo (tj. v přirozených podmínkách, přímo v těle), a zejména o porovnání degradace in vivo a in vitro („ve skle“) [13].

Shoda mezi výsledky koroze in vivo a in vitro silně závisí na elektrolytu zvoleném pro laboratorní studie. Anatomické umístění implantátu i chirurgický zákrok mohou také ovlivnit následné degradační chování. Proto není dostatek informací o podrobných podmínkách in vivo, které by umožnily pochopit původ různých pozorovaných rychlostí koroze [13].

### **2.3.3 Simulovaný fyziologický roztok**

Pro testy in vitro se používají místo původních tělních tekutin různé simulované fyziologické roztoky (SFR), které je napodobují chemickým složením, viz tabulka 4 [23]. Mezi nejjednodušší zástupce SFR patří 0,9 % NaCl, který však neposkytuje dobrou shodu mezi výsledky in vitro a in vivo testy [24].

Hankův roztok (HR) patří mezi běžně využívaný fyziologický roztok. V tomto roztoku je sníženo množství vápníku a upravena koncentrace fosfátů. Hořčík může být přidáván ve formě síranů jako  $MgSO_4$ . Roztok může také obsahovat D-glukózu. Roztoky, jako je Hankův, byly navrženy hlavně ke krátkodobému uchování životaschopných buněk [25].

Existují také SFR, které napodobují chemické složení určitých biologických tekutin v těle. Příkladem je simulovaná synoviální tekutina<sup>1</sup>, která se nachází v okolí kolenního kloubu. Tato tekutina je vhodná pro testy in vitro, které se zabývají korozi implantátů. Jak vyplývá z mé rešerše, doposud nebyla publikovaná práce, která by se věnovala korozi kovových implantátů v prostředí simulované synoviální tekutiny [27].

Tabulka 4: Složení roztoku NaCl, simulované synoviální tekutiny (SST) a Hankova roztoku (HR) [25,27,28,29]

	0,9 % NaCl	SST	HR
čínidlo	množství [g/l]	množství [g/l]	množství [g/l]
NaCl	9	8	8
KCl	-	0,2	0,4
CaCl <sub>2</sub>	-	-	0,14
MgSO <sub>4</sub>	-	-	0,098
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	1,44	0,048
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,24	0,06
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	0,35
D-glukóza	-	-	1

Chloridové a fosfátové ionty hrají důležitou roli při korozi Mg. Fosfáty jsou dobře známé inhibitory koroze, takže se očekává, že přítomnost fosforečnanů sníží rychlost koroze Mg. Ionty jsou přítomny v krevní plazmě a syntetických fyziologických roztocích, jako je Hankův roztok. Tento roztok obsahuje anorganické složky krevní plazmy v podstatě ve stejných koncentracích jako v krvi a mimo to má roztok nižší koncentraci hydrogenuhličitanu a vyšší koncentraci chloridů [23].

Rychlost koroze slitin hořčíku se významně liší v závislosti na použitém SFR. Kromě toho může hrát rozhodující roli i typ použitého pufru. Vzniklé produkty koroze ovlivňují rychlost koroze, přičemž u těžko rozpustných produktů koroze se neuskuteční úplná degradace implantátu. Místo toho dochází k postupné přeměně kovového materiálu na korozní produkty [13].

Různé korozní vrstvy vytvořené na povrchu Mg v SFR a v médiu buněčné kultury (anorganické složky, aminokyseliny, glukóza) ovlivňují následné chování při ochraně proti korozi. V médiu se tvoří na povrchu Mg typicky více ochranných vrstev. Díky těmto vrstvám byla prokázána až dvacetkrát vyšší odolnost proti korozi, než u čerstvě ponořeného vzorku. Průřezová charakterizace vzorků ukázala vytvoření dvojvrstvého korozního produktu na povrchu, který se skládá z vnitřní porézní vrstvy a kompaktní vnější vrstvy. Vyšší hodnota pH zpomaluje rozpouštění Mg, což zpomaluje tvorbu bublin a napomáhá vytváření kompaktní korozní vrstvy na povrchu [13].

<sup>1</sup>Synoviální tekutina je čirá viskózní tekutina, která vyplňuje všechny dutiny v synoviálních kloubech. Funguje jako přirozený lubrikant těla, který chrání tkáň před poškozením během pohybu. Jedná se o ultrafiltrát krevní plazmy, který si uchová většinu svého složení elektrolytu a organických molekul s nízkou molekulovou hmotností. Tento lineární polymer tvoří volně zapletenou síť, která může podstoupit významné stupně deformace (závisí na změnách koncentrace a molekulové hmotnosti) [26].

Tkacz a spol. píší o použití slitin AZ31 a AZ61. Článek popisuje korozní chování v Hankově roztoku (bez přítomnosti iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ ). Autoři ukázali, že s rostoucím časem expozice dochází ke zvyšování korozní odolnosti obou slitin. Slitina AZ61 dosahovala vyšších hodnot polarizačních odporů  $R_p$  (čili nižší rychlosti koroze) oproti slitině AZ31 [30].

K odlišným výsledkům dospěla Horynová a spol., která pozorovala u slitiny AZ31 mnohem lepší korozní odolnost ve srovnání se slitinou AZ61 (v mlze neutrálního roztoku 5 % NaCl). Hloubka korozního napadení pro slitinu AZ31 a AZ61 byla na počátku stejná, avšak s přibývajícím časem expozice se u slitiny AZ61 projevil rychlejší nárůst [31].

Degradace Mg a jeho slitin je zkoumána v různých SFR, ale doposud není žádná studie, která by zohlednila vliv hyaluronové kyseliny, která se ve vysoké koncentraci nachází v synoviální tekutině v okolí kloubu. Pro tyto účely se dá využít právě simulovaná synoviální tekutina [29].

## 2.4 Hyaluronan

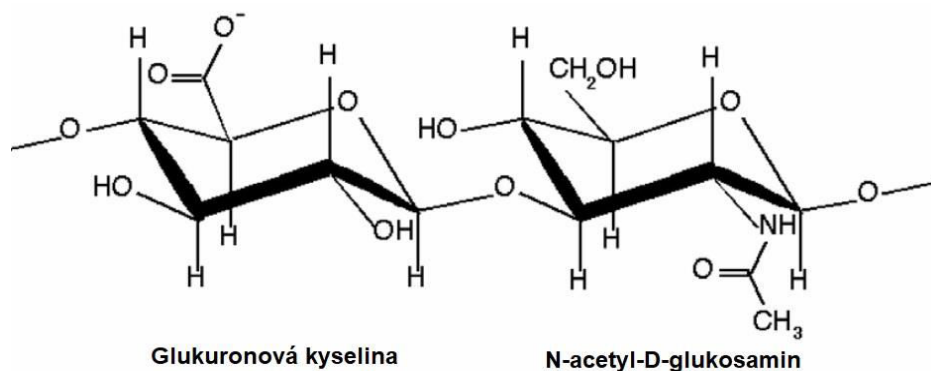
### 2.4.1 Základní popis hyaluronanu

Hyaluronan (HY) je negativně nabitý lineární polysacharid [32]. Tento řetězec tvoří kovalentní strukturu, která se skládá ze střídající se  $\beta$ -D-glukuronové kyseliny a N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminu (viz obrázek 2) [33].

Molekuly hyaluronanu tvoří volně zapletenou trojrozměrnou síť vzájemně se prostupujících řetězců. Tato síť nevykazuje žádné silné intermolekulární vazby mezi řetězci, ale je vysoce viskoelastická kvůli vzájemným makromolekulárním efektům shlukování. Ty způsobují, že efektivní koncentrace je mnohem vyšší než skutečná koncentrace [34].

HY je důležitou složkou mezibuněčné hmoty. Má schopnost na sebe vázat velké množství vody a přispívat tak k optimální hydrataci tkáně [32]. Také tvoří intermolekulární vodíkové vazby. Vyskytuje se jako volný řetězec nebo kovalentně vázaná na bílkoviny [35].

HY hraje v ortopedické aplikaci zásadní roli. Pomáhá při vývoji chrupavky, udržování synoviální tekutiny a regeneraci šlach. Působí také jako mazivo a tlumič nárazů v kloubech [4]. Dále působí jako lapač (scavenger) škodlivých volných radikálů a dalších chemických látek [33].



Obrázek 2: Struktura hyaluronové kyseliny [36]

### 2.4.2 Výskyt hyaluronanu

Hyaluronan je přítomen v různých tělních tkáních včetně synoviální tekutiny, sklivce, mozku a chrupavky [3]. Nachází se v tkáních obratlovců jako klíčová složka extracelulární matrice [6]. Lidské tělo o hmotnosti 70 kg obsahuje přibližně 12–15 g této látky, která je neustále obnovována [32]. Molekulová hmotnost HY v normálních biologických tekutinách a tkáních je velmi vysoká (asi 1 000–8 000 kDa) [33].

Hyaluronan je hlavní složkou synoviální tekutiny kloubu, kde poskytuje viskoelasticitu a lubrikaci, jež jsou nezbytné pro ochranu povrchů chrupavky. Jeho koncentrace v lidském kolenním kloubu je přibližně 2–3 mg/ml, o něco vyšší je u mladší populace než u starších lidí. V normální lidské synoviální tekutině je většina hyaluronanu velmi vysoké molekulové hmotnosti. Průměrná hmotnost je přibližně 6 000–7 000 kDa [33].

Hyaluronan je také hlavní složkou sklivce. Sklivec lidského oka má nižší koncentraci, a to přibližně 200 µg/ml. V koncentraci 0,1–18 µg/ml je hyaluronan obsažen v lidské lymfatické tekutině. V krevním séru zdravých lidských dospělých je koncentrace kyseliny nižší, obvykle mezi 10 a 100 ng/ml, průměrně kolem 30 ng/ml. Normální lidská moč také obsahuje nízkou hladinu HY, přibližně 100–300 ng/ml a lidské mléko obsahuje přibližně 200–800 ng/ml [33].

Zatímco normální koncentrace kyseliny v lidském séru je obvykle menší než 40 ng/ml, u člověka trpící jaterní cirhózou je zvýšená (vyšší než 46,5 ng/ml) a při onemocnění revmatoidní artritidou se uvádí množství až 200 µg/ml. Malé, ale významné zvýšení HY v séru (často dvojnásobné) se vyskytuje u několika typů neléčitelné rakoviny [33].

Lidské mléko obsahuje hlavně HY s průměrnou hodnotou molekulové hmotnosti přibližně 440 kDa. Lidská plodová voda obsahuje HY s průměrnou molekulovou hmotností asi 330 kDa (po šestnácti týdnech těhotenství). Distribuce hmotnosti se změní po čtyřiceti týdnech těhotenství na směs vysoké a velmi nízké molekulové hmotnosti HY [33].

### 2.4.3 Chování hyaluronanu v roztoku

Chování molekul hyaluronanu ve fyziologickém roztoku je ovlivněno chemickou strukturou disacharidu, vnitřními vodíkovými vazbami a také vzájemnou interakcí tohoto biopolymeru s rozpouštědlem [36]. Dále záleží na koncentraci a molekulové hmotnosti [38].

Molekula HY obsahuje skupiny -COOH, které se ve vodných roztocích za fyziologických podmínek disociují, a proto se molekula chová jako záporně nabitý polyelektrolyt. To způsobuje interakci s kladnými ionty [39].

Podle Yanakiho a Yamaguchiho jsou řetězce hyaluronanu s molekulovou hmotností vyšší než 1 600 kDa zapleteny do trojrozměrné polymerní struktury, což vede k omezenému transportu molekul polysacharidů. Naproti tomu řetězce HY s nižší molekulovou hmotností jsou dispergovány v roztoku [40].

Trojrozměrná síť hyaluronanu v kombinaci s vysokou molekulovou hmotností a četnými vzájemně se odpuzujícími aniontovými skupinami umožňuje kyselině přijmout struktury

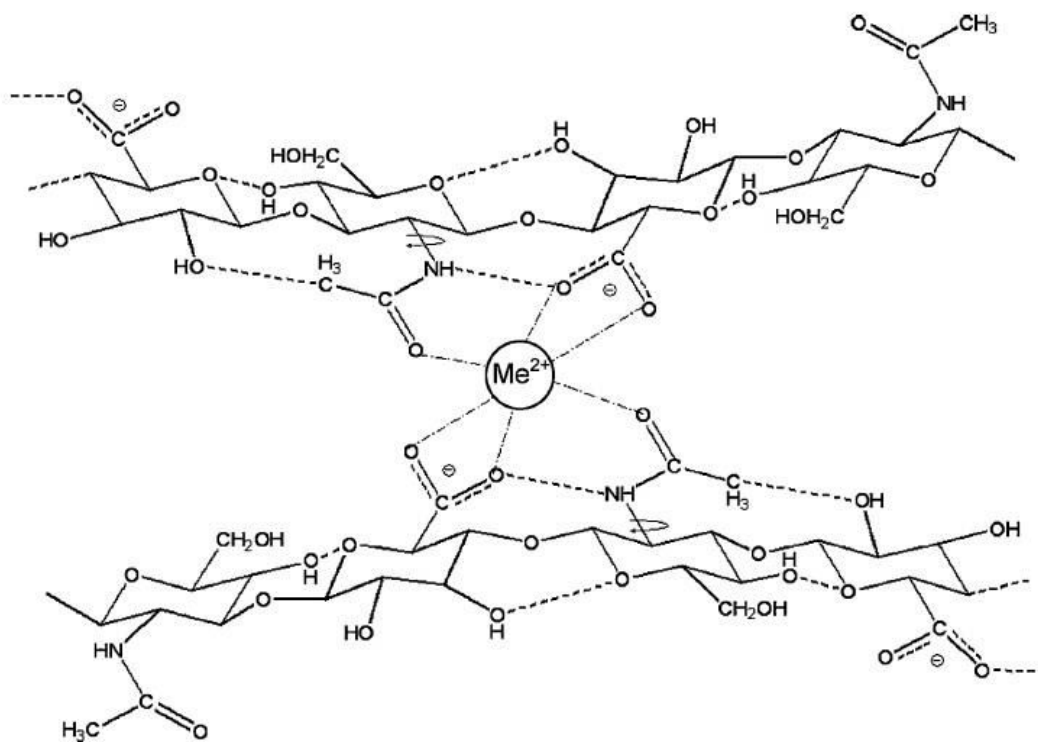
náhodných šroubovic. Šroubovice mohou mít poloměr gyrace 300 nm, který lze díky jejich rychlým pohybům popsat jako vysoce hydratované koule. Ty zabírají hydrodynamické objemy zhruba 1 000krát větší než ty, které zaujímají samotné „suché“ polymery. Hydrodynamický objem jednotlivých šroubovic se zvyšuje s molekulovou hmotností [34].

Mnoho polysacharidů nese řadu donorových skupin elektronových párů, které vážou protony nebo ionty kovů. V případě bivalentních kationtů to vede k tvorbě chelátových komplexů doprovázených rostoucím stupněm zesíťování uvnitř nebo mezi polymerními řetězci [41].

Hyaluronátové řetězce ( $4,0 \cdot 10^5$ – $1,7 \cdot 10^6$  g/mol) ve vodných roztocích při pH 6 váží bivalentní kationty jako např.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Pb}^{2+}$ . Jeden bivalentní kation je vázán přibližně pěti disacharidovými jednotkami. Ionty těžkých kovů ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) se vážou na hyaluronátový řetězec silněji než jejich lehčí protějšky ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) [42].

Bivalentní kationty jsou částečně imobilizovány nabitým polysacharidem. Mobilita velké části iontů je omezena jejich vazbou na hyaluronátový řetězec, což vede ke snížení specifické vodivosti. Vliv bivalentních kationtů na HY vede ke snížené viskozitě roztoku kvůli zmenšení hydrodynamického poloměru molekul [41]. Skutečnost, že viskozita roztoku je snížena interakcí s kationty, svědčí o tom, že k vazbě dochází intramolekulárním způsobem, což nevede k vazbám mezi molekulami [42].

Na obrázku 3 je znázorněna struktura chelátového komplexu tvořena dvojmocným kationtem ( $\text{Me}^{2+}$ ) a dvěma disacharidovými jednotkami hyaluronátu. Oba disacharidy patří do jednoho řetězce a jsou součástí opakujícího se bloku, který se skládá z pěti disacharidových jednotek.



Obrázek 3: Struktura chelátového komplexu [42]

Kovový iont interaguje se šesti atomy kyslíku, které patří ke dvěma N-acetylovým skupinám a dvěma karboxylátovým skupinám protilehlých částí řetězce [42].

Podle Furtha a spol. je nejpravděpodobnější strukturou vytvořenou interakcí mezi bivalentním kationtem a hyaluronanem oktaedrický komplex, který zahrnuje N-acetylové skupiny a karboxylátové skupiny dvou disacharidových jednotek [42].

Avšak autoři naznačují, že N-acetylová skupina se neúčastní koordinační vazby s ionty vápníku. Domnívají se, že vápenatý kation vytváří můstky se dvěma karboxyláty a třemi páry molekul vody. Tato struktura byla navržena pro vápenaté a měďnaté ionty, ale pravděpodobně ji lze vztáhnout i na hořečnaté ionty, neboť podle jiné studie jsou koordinační vlastnosti vápníku a hořčíku velmi podobné [43].

## **2.5 Současné poznatky o vlivu hyaluronanu na korozi v biomedicínských aplikacích**

Biologické přijetí ortopedických implantátů hraje zásadní roli při urychlení hojení kostní tkáně obklopující implantáty. Vědci se snaží zlepšit interakci buněk s povrchem kovových implantátů imobilizací složek extracelulární matrice a různými biopolymery [37]. Přírodní biodegradovatelné polymery včetně kolagenu a polysacharidů (jako je chitosan a hyaluronan) se používají k utěsnění porů povlaku za účelem dobré ochrany a biologické kompatibility [44].

V dřívějších studiích bylo poznamenáno, že přítomnost lubrikantu v synoviální složce významně mění korozní chování slitin. Literatura se ovšem zabývá především vlivem hyaluronanu na korozi implantátů z nedegradabilních kovů, jako je ocel, nebo slitiny titanu [29].

Studium slitiny Ti-13Ta-29Nb-4,6Zr ukázalo pomalý vznik pasivní vrstvy v Hankově roztoku obsahujícím HY. Navíc vrstva vykazovala vysokou pórovitost a v důsledku toho i vysokou korozní rychlost. Na druhou stranu, porézní vrstva vykazuje lepší osseointegraci [29].

V jiné studii bylo podobně pozorováno, že se zvýšením koncentrace HY dochází ke zpomalení tvorby filmu na nezerové oceli 316L a tím ke zvýšenému rozpouštění kovu v roztoku [4].

Také bylo popsáno chování slitiny CoCrMo v Hankově roztoku obsahující HY. Přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$  iontů se ukázala jako nezbytná pro interakci mezi povrchem oxidu chromu a hyaluronovým řetězcem. Autoři vyslovili předpoklad, že  $\text{Ca}^{2+}$  ionty podporují štěpení HY na menší jednotky, které pak chemicky reagují s fosforečnanem vápenatým. HY zvyšuje aktivitu alkalické fosfatázy, což naznačuje její příznivý účinek na osteogenní aktivitu [8].

Doposud však neexistuje práce, která by se zabývala vlivem hyaluronanu na korozi hořčíku a jeho slitin. Nicméně v posledních letech se objevují práce, které využívají hyaluronanu k modifikaci povlaků hořčíkových materiálů pro lékařské účely [37].

Hyaluronan poskytuje vhodné prostředí pro růst buněk [45] a je zapojen do různých biologických funkcí jako je buněčná adheze, proliferace (růst buněk nebo tkáně) a diferenciace. HY má také protizánětlivé, bakteriostatické, fungistatické, proangiogenetické

(angio = cévy) a osteoindukční (přeměna pojivové tkáně na podpůrnou) vlastnosti [37], které lze využít pro úpravu implantátů. Pro vývoj hořčíkových materiálů může být také využito schopnosti HY zamezující adhezi bakteriálních buněk díky svým aniontovým a hydrofilním vlastnostem [45].

Hyaluronan vhodné molekulové hmotnosti lze tedy použít k úpravě povrchu kovových implantátů pro ortopedické aplikace. Obecně je nejvíce distribuovanou formou v normální tkáni vysokomolekulární hmotnost HY ( $h\text{-HY} > 1 \cdot 10^3$  kDa). L-HY je hyaluronan s nízkou molekulovou hmotností ( $< 1 \cdot 10^3$  kDa) [37].

Adheze a proliferace osteoblastů je významně snížena vysokomolekulárním HY ( $> 1 \cdot 10^3$  kDa) imobilizovaným na hořčíkových substrátech ve srovnání s nízkomolekulárním HY. Na druhou stranu, vysokomolekulární HY významně zvyšuje osteogenní diferenciaci osteoblastů [37].

Dále např. polydopamin (PDA) tvoří tenký povlak a to téměř na všech površích pomocí kovalentní nebo nekovalentní interakce. PDA prokázal velký aplikační potenciál při ochraně proti korozi kovů [45].

Pro použití kostního implantátu byl na hořčíkovou slitinu AZ31 připraven kompozitní povlak PDA/HY. Vnitřní vrstva PDA nejen fungovala jako korozní pasivační vrstva, ale také poskytla podklad pro imobilizaci hyaluronanu. Testy in vitro v SFR ukázaly velmi dobrou odolnost proti korozi. Kompozitní povlak PDA/HY potvrdil výbornou kompatibilitu buněk a ty vykazaly dobrou adhezi. HY poskytl příznivé podmínky pro růst buněk [45].

### **3 CÍLE**

- 1) Základní rešerše koroze hořčíku a jeho slitin v simulovaných tělesných tekutinách s ohledem na jejich využití v medicíně.
- 2) Rešerše vlivu hyaluronové kyseliny na korozi kovových materiálů v simulovaných tělesných tekutinách.
- 3) Na základě literární rešerše navrhnout a realizovat experimenty.
- 4) Zjistit vliv hyaluronové kyseliny na korozi hořčíkové slitiny AZ31 využitím především elektrochemických metod.
- 5) Charakterizace korozních produktů.



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použitý materiál a roztoky

#### 4.1.1 Materiál a jeho příprava

Pro experimenty byla použita hořčíková slitina AZ31 s chemickým složením uvedeným v tabulce 5. Elementární analýza hořčíkového substrátu byla provedena za použití optické emisní spektroskopie s výbojem (GDOES) na přístroji Spectrumat GDS 750 (Spectrums Analytik GmbH, Hof, Německo).

Tabulka 5: Chemické složení hořčíkové slitiny AZ31

chemické složení [hm. %]						
Al	Zn	Mn	Si	Fe	Sn	zůstatek
3,6	1,34	0,28	0,03	0,002	0,01	94,738

Z plátu slitiny AZ31 bylo pomocí vodou chlazené pily nařezáno několik desítek vzorků o rozměrech 25 mm × 25 mm × 4 mm. Čtvercové vzorky byly mechanicky broušeny pomocí SiC papírů č. 440, 1200, 4000. Dále byly leštěny s použitím diamantových past o zrnitosti 3, 1 a 0,25 μm na leštící podložce. Tyto zrcadlově lesklé vzorky byly opláchnuty isopropanolem a vysušeny.

#### 4.1.2 Roztoky a jejich příprava

Experimenty byly prováděny v 0,9 % roztoku NaCl a v prostředí simulované synoviální tekutiny (SST). K těmto roztokům byl přidáván hyaluronan s nízkou (80–130 kDa) nebo vysokou (1 500–1 750 kDa) molekulovou hmotností o koncentraci 0, 0,25, 1 a 3 g/l.

Hyaluronan byl získán od společnosti Contipro Biotech (Dolní Dobrouč, Česká republika), která ho vyrábí extrakcí z buněčných stěn bakterie *Streptococcus zooepidemicus*.

### 4.2 Použité metody a přístroje

#### 4.2.1 Elektrochemické korozní testy

Elektrochemické korozní testy byly prováděny pomocí potenciodynamické polarizace (PD) a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) s použitím potenciostatu BioLogic VSP-300.

Připravený vzorek byl umístěn do dvouplášťové korozní cely s exponovanou oblastí 1 cm<sup>2</sup> jako pracovní elektroda. Do korozní cely byla připojena pomocná elektroda (platinová síťka) a referenční elektroda (nasycená kalomelová elektroda – SCE, +0,242 V vs. SHE).

Roztoky (300 ml) zahřáté na teplotu 37 ± 1 °C (kvůli simulaci lidského těla) byly postupně nality do korozní cely.

Na vzorek bylo vkládáno napětí v rozmezí potenciálů od –0,2 V do +0,2 V se stálou rychlostí 1 mV·s<sup>-1</sup> proti potenciálu otevřeného obvodu (OCP) a byly tím získány křivky PD. Každé měření bylo provedeno po 30 minutách stabilizace.

U EIS byl v případě hořčíkových slitin preferován frekvenční rozsah od 100 kHz do 10 mHz s amplitudou 10 mV při potenciálu nezatíženého obvodu.

Data EIS byla shromažďována po 5 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h a 96 h ponoření. Data byla analyzována a vyhodnocena příslušnými ekvivalentními obvody pomocí softwaru Ec-Lab.

#### **4.2.2 Charakterizace povrchu SEM-EDS**

Morfologie povrchu vzorků po korozi bylo analyzováno pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) Zeiss EVO LS-10 (Carl Zeiss Ltd., Cambridge, Velká Británie) vybaveného energeticky disperzní rentgenovou spektroskopií (EDS, Oxford Instruments plc, Abingdon, Velká Británie).

#### **4.2.3 XPS analýza korozních produktů**

Metoda XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) patří k nejběžnějším metodám povrchové analýzy. Jedná se o povrchově selektivní, nedestruktivní a citlivou techniku, která poskytuje informace o chemickém složení a elektronové struktuře povrchů pevných látek.

XPS spektra byla měřena spektrometrem Kratos AXIS Ultra DLD s použitím monochromatického zdroje Al K $\alpha$ , který pracoval při 150 W (10 mA, 15 kV). Spektra s vysokým rozlišením byla získána pomocí analytické oblasti  $\sim 300 \times 700 \mu\text{m}$  a energie průchodu 20 eV s velikostí kroku 0,1 eV. Tlak v komoře analyzátoru byl nižší než  $2 \times 10^{-7}$  Pa. Pro všechny analýzy byl použit systém Kratos neutralizátor náboje. Zjištěné vazebné energie prvků byly připsané na základě dostupných databází.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Potenciodynamická polarizace

Pomocí potenciodynamických zkoušek byly získány hodnoty korozní proudové hustoty  $i_{corr}$  a korozního potenciálu  $E_{corr}$  pro slitinu AZ31 v různých médiích. Obdržené údaje umožňují určit korozní rychlost a tedy korozní odolnost zkoumaného materiálu.

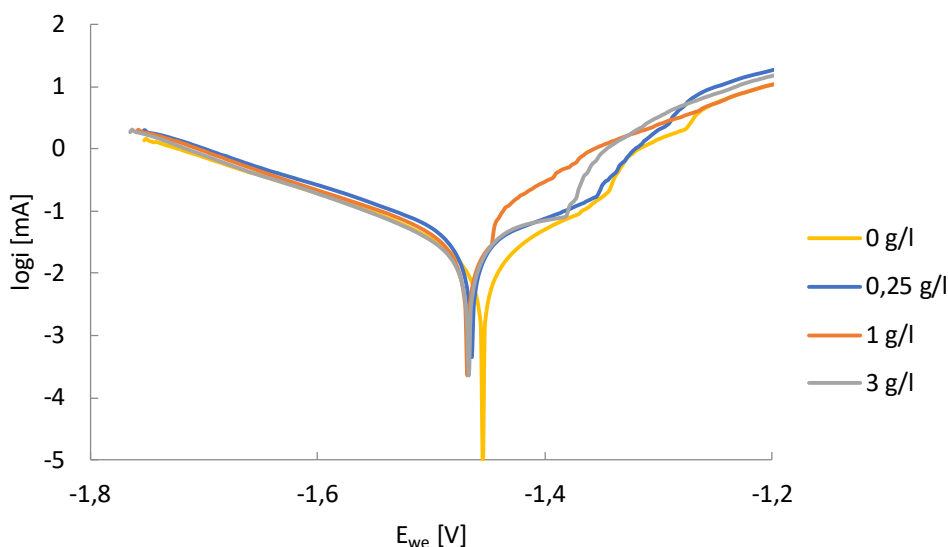
Z kinetického hlediska platí: čím vyšší hodnota korozní proudové hustoty ( $i_{corr}$ ), tím vyšší rychlost koroze. Z termodynamického hlediska platí: čím kladnější korozní potenciál ( $E_{corr}$ ), tím nižší korozní rychlost.

V případě přidavku l-HY i h-HY do roztoku NaCl byla naměřena nejvyšší rychlost koroze slitiny AZ31 při koncentraci 0,25 g/l HY, viz tabulka 6. Vyšší koncentrace nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu vedly ke snížení rychlosti koroze. Zvláště patrný pokles korozní rychlosti byl u vysokomolekulárního hyaluronanu (3 g/l), přičemž korozní proudová hustota byla dokonce šestkrát nižší než v případě 0,9 % NaCl. Nejnižší korozní rychlost zaujímá u l-HY slitina v roztoku NaCl. Průběhy potenciodynamických křivek v prostředí NaCl s a bez hyaluronanu jsou zobrazeny na obrázku 4 a obrázku 5.

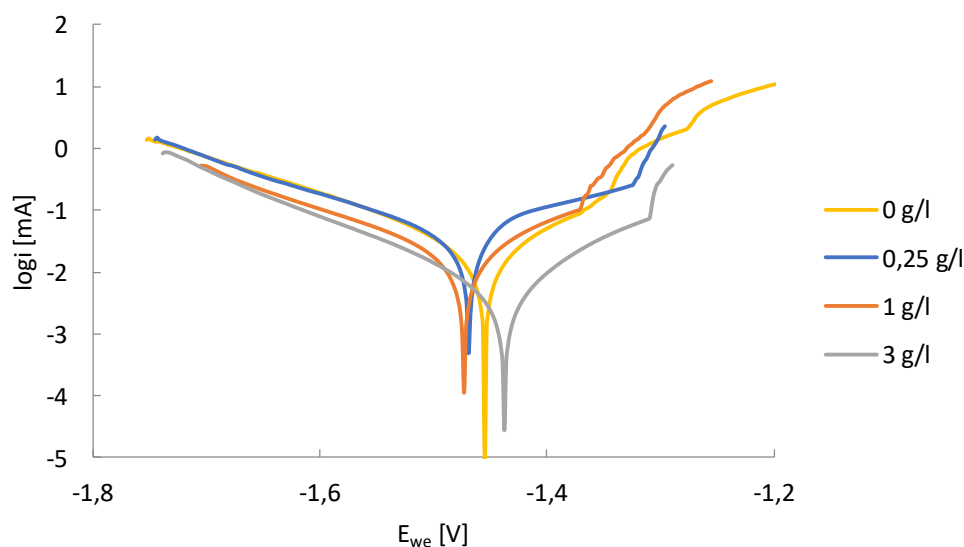
V roztoku NaCl má l-HY dle potenciálu nejvyšší korozní rychlost slitina při koncentraci 1 g/l a klesá se 3 g/l, 0,25 g/l a nejnižší rychlost je u slitiny bez přidavku HY. U h-HY vyšla nejvyšší korozní rychlost slitiny při koncentraci 1 g/l, dále 0,25 g/l, bez přidavku HY a nejnižší rychlost obsadila nejvyšší koncentrace HY, a to 3 g/l.

Tabulka 6: Slitina AZ31 s různými koncentracemi a molekulovými hmotnostmi HY v NaCl

$M_{wHY}$ [kDa]	$c_{HY}$ [g/l]	0	0,25	1	3
80–130	$E_{corr}$ [mV]	–1 449,15	–1 461,40	–1 478,16	–1 466,73
80–130	$i_{corr}$ [ $\mu A/cm^2$ ]	18,89	28,21	25,71	24,13
1 500–1 750	$E_{corr}$ [mV]	–1 449,15	–1 472,42	–1 473,54	–1 439,11
1 500–1 750	$i_{corr}$ [ $\mu A/cm^2$ ]	18,89	32,46	15,76	3,21



Obrázek 4: Závislost  $\log i$  na  $E_{we}$  pro slitinu AZ31 v roztoku NaCl s HY ( $M_w = 80–130$  kDa) o různých koncentracích



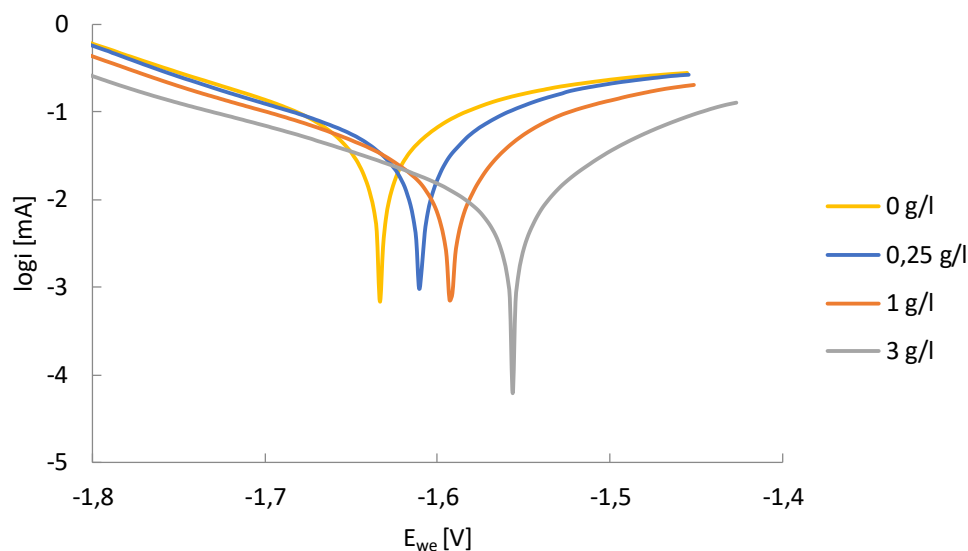
Obrázek 5: Závislost  $\log i$  na  $E_{we}$  pro slitinu AZ31 v roztoku NaCl s HY ( $M_w = 1\,500–1\,750$  kDa) o různých koncentracích

Z hodnot  $i_{corr}$  v roztoku SST (u l-HY i h-HY), viz tabulka 7, lze vyčíst, že čím vyšší koncentrace HY je do roztoku přimíchána, tím nižší bude korozní rychlost slitiny AZ31. Nejvyšší rychlost koroze slitiny nastala tedy u roztoku SST bez přidání HY. Průběh potenciodynamických křivek v prostředí SST s a bez hyaluronanu jsou zobrazeny na obrázku 6 a obrázku 7.

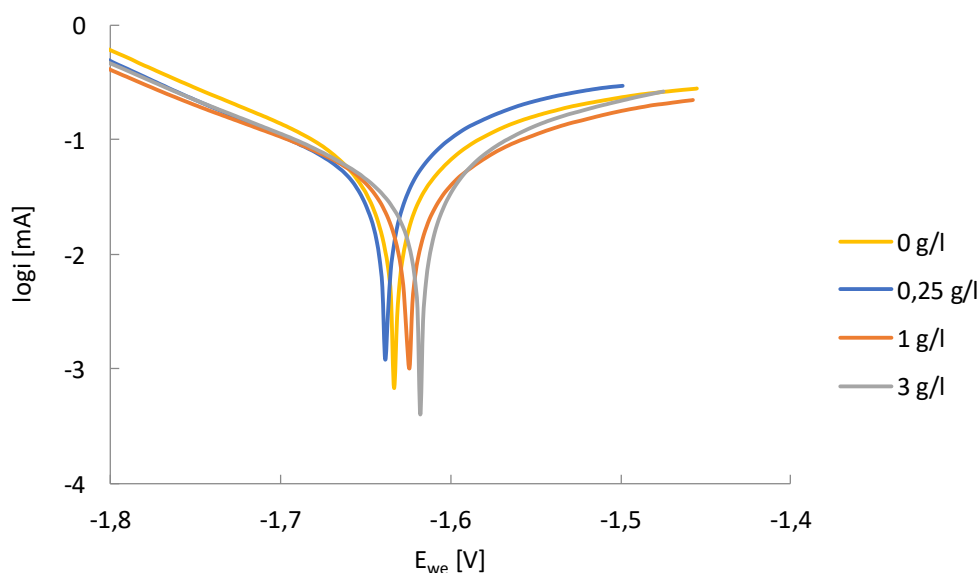
Z hlediska potenciálu je v roztoku SST trend stejný jako u hodnot  $i_{corr}$  – čím vyšší koncentrace HY, tím kladnější korozní potenciál a tím tedy nižší korozní rychlost slitiny.

Tabulka 7: Slitina AZ31 s různými koncentracemi a molekulovými hmotnostmi HY v SST

$M_{wHY}$ [kDa]	$c_{HY}$ [g/l]	0	0,25	1	3
80–130	$E_{corr}$ [mV]	-1 633,50	-1 637,92	-1 624,10	-1 617,68
80–130	$i_{corr}$ [ $\mu A/cm^2$ ]	54,58	44,05	39,47	37,30
1 500–1 750	$E_{corr}$ [mV]	-1 633,50	-1 610,10	-1 593,28	-1 556,05
1 500–1 750	$i_{corr}$ [ $\mu A/cm^2$ ]	54,58	36,45	24,34	11,22



Obrázek 6: Závislost  $\log i$  na  $E_{we}$  pro slitinu AZ31 v roztoku SST s HY ( $M_w = 1\,500\text{--}1\,750$  kDa) o různých koncentracích



Obrázek 7: Závislost  $\log i$  na  $E_{we}$  pro slitinu AZ31 v roztoku SST s HY ( $M_w = 80\text{--}130$  kDa) o různých koncentracích

Na obrázcích 4, 5, 6 a 7 jsou zobrazeny anodické polarizační křivky hořčíkové slitiny AZ31, které se neřídí podle Tafelovy rovnice (zvláště v prostředí NaCl), proto pro určení  $i_{corr}$  byla použita pouze katodická větev polarizační křivky. Obdržené  $i_{corr}$  však neodráží zcela přesnou

hodnotu rychlosti koroze, jak je to běžné pro hořčíky a jeho slitiny [13]. Grafická zobrazení polarizačních křivek však přesto naznačují, že se zvyšující se koncentrací HY v SST dochází k mírnému poklesu  $i_{corr}$  (pokles katodických ramen dolů), neboli k poklesu rychlosti koroze. U anodických větví pro korozní prostředí s NaCl (na rozdíl od SST) lze občas vidět zlomy, které indikují pitting. Konzistentní tvar jednotlivých potenciodynamických polarizačních křivek naznačuje, že přítomnost hyaluronanu za různých koncentrací nemění mechanismus rozpouštění hořčíku (anodické reakce).

Závěry získané metodou potenciodynamické polarizace se liší od těch, které byly zjištěny EIS metodou, co se týče hyaluronanu. Tato skutečnost souvisí s rozdílným principem obou metod a úloha hyaluronanu během koroze AZ31 je specifikována v následující kapitole, která se věnuje EIS měření.

## 5.2 Elektrochemická impedanční spektroskopie

Získaná data metodou EIS jsou znázorněna ve formě Nyquistových křivek na obrázcích 10, 11, 12, 13 a 14 pro roztok NaCl a obrázky 17, 18, 19, 20 a 21 pro prostředí SST. Data byla vyhodnocena použitím vhodně navržených ekvivalentních elektrických obvodů, jak je níže popsáno.

### 5.2.1 Prostředí NaCl

Data byla modelována pomocí dvou ekvivalentních elektrických obvodů, jejichž schémata jsou zobrazena na obrázku 8 a 9. Prvky s konstantním fázovým posunem (*CPE*) namísto kapacity v modelech byly vybrány, aby byla zohledněna nehomogenita povrchu (drsnot, pórovitost) elektrochemického rozhraní. Impedance *CPE* je definována následovně (rovnice (3)):

$$Z_{CPE} = 1/Y(j\omega)^a \quad (3)$$

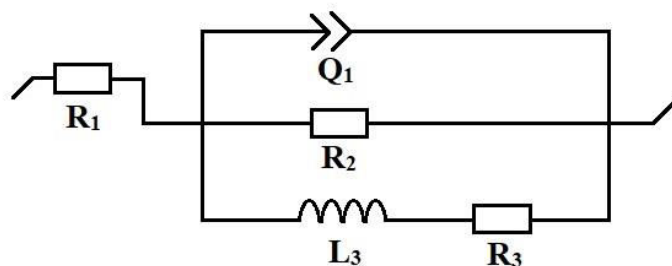
kde „*Y*“ je parametr týkající se kapacity, „*j*“ je imaginární jednotka, „*ω*“ úhlová frekvence a „*a*“ je koeficient mezi 0 a 1.

Na základě zvolených modelů byly obdrženy veličiny pro jednotlivé prvky ekvivalentního obvodu, z nichž jsou prezentovány pouze hodnoty polarizačního odporu ( $R_p$ ), který je mírou rychlosti koroze. Čím vyšší polarizační odpor, tím nižší korozní rychlost. Stanovení polarizačního odporu bylo stanoveno z údajů EIS, jak je doporučeno v literatuře [46]. Vypočítané polarizační odpory pro prostředí 0,9 % roztoku NaCl jsou uvedeny v tabulce 8. Polarizační odpor pro model A (na obrázku 8) byl vypočten podle rovnice (4):

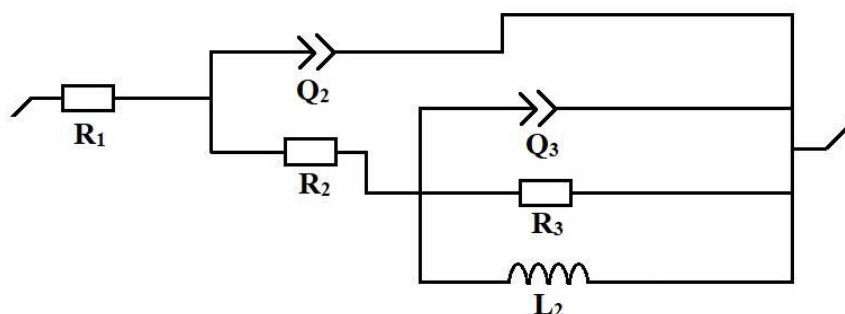
$$R_p = \frac{1}{R_2} + \frac{1}{R_3} \quad (4)$$

a pro model B (uvedený na obrázku 9) byl polarizační odpor zjištěn podle rovnice (5):

$$R_p = R_2 + \frac{1}{R_3} \quad (5)$$



Obrázek 8: Schéma použitého obvodu A při měření metodou EIS



Obrázek 9: Schéma použitého obvodu B při měření metodou EIS

Tabulka 8: Slitina AZ31 v roztoku NaCl s různými koncentracemi a molekulovými hmotnostmi HY

$M_{wHY}$ [kDa]	-	80–130	80–130	1 500–1 750	1 500–1 750
$c_{HY}$ [g/l]	0	0,25	3	0,25	3
$t$ [hod]	$R_p$ [ $\Omega$ ]				
1/12	467	1 616*	2 630*	540	499
1	214	249	3 360*	145	257
2	409	232	3 691*	216	551
4	696	391	478	513	970
8	861	249	251	416	892
16	845	433	497	867	1 169
24	707	500	790	816	543
48	1 123	681	1 012	640	1 024
96	1 353	959	1 039	969	1 149

\*u těchto hodnot byl použit pro výpočet polarizačního odporu obvod B; pro všechny ostatní obvod A

Pro 0,9 % roztok NaCl byl k vyhodnocení Nyquistových křivek použit ekvivalentní elektrický obvod A. Tento obvod se skládá z následujících pěti prvků: odpor roztoku ( $R_s$ ), konstantní fázový posun ( $CPE$ ) vrstvy korozních produktů, odpor vrstvy ( $R_2$ ), indukčnost ( $L_3$ ) a odpor indukčnosti ( $R_3$ ). Z Nyquistových diagramů je patrné, že se vyznačují jednou kapacitní smyčkou při vysoké frekvenci a jednou indukční smyčkou při nízké frekvenci. Přítomnost indukční smyčky může souviset s adsorpcí a desorpcí meziproduktů, jako jsou kationty hořčíku nebo jiné ionty přítomné v korozivním médiu (např.  $Cl^-$ ) [47] a také může souviset s důlkovou korozí nebo se zrychleným anodickým rozpouštěním [46].

Hodnoty polarizačních odporů pro AZ31 v 0,9 % roztoku NaCl se měnily v čase v důsledku dynamické povahy koroze. Proces lze charakterizovat jako konkurenci mezi tvorbou částečně ochranné vrstvy  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  na povrchu substrátu a rozpuštěním této vrstvy způsobeným hlavně atakem chloridů za vzniku rozpustného  $\text{MgCl}_2$  (viz rovnice (2) v teoretické části). To je v souladu s pozorovanými tvary Nyquistových křivek, protože průměry vysokofrekvenčních kapacitních smyček se během doby ponoření jasně měnily. Na konci experimentu dosáhla rychlost koroze nejnižší hodnoty.

Velmi podobné korozní chování bylo také pozorováno u AZ31 v 0,9 % roztoku NaCl v přítomnosti 0,25 g/l a 3 g/l hyaluronanu s vysokou molekulovou hmotností, jak dokazují tvary Nyquistových křivek a hodnoty polarizačního odporu. Opět byl aplikován model A odrážející dva korozní procesy probíhající současně na povrchu AZ31 – tvorbu vrstvy korozních produktů a anodické rozpouštění. V tomto případě se však na korozi podílely také molekuly hyaluronanu. Ty navázaly ionty hořčíku uvolněné v blízkosti povrchu elektrody, čímž vytvořily komplexní sloučeninu, která mohla být transportována do roztoku od povrchu. Komplex hořečnatých iontů vznikl na úkor vytvoření částečně ochranného hydroxidu hořečnatého.

Předpokládá se, že přítomnost karboxylátů je rozhodující pro vznik komplexů. Karboxylové skupiny hyaluronanu se mohou nacházet ve formě aniontů během koroze slitiny AZ31, protože povrchová alkalizace se může pohybovat v rozmezí pH 10–12 v nepřítomnosti pufru v důsledku hydrolyzy iontu hořčíku. V našich experimentech naměřené pH 0,9 % roztoků NaCl s hyaluronanem a bez něho vzrostlo ze 7,4 na  $8,7 \pm 0,2$ , což naznačuje, že pH na povrchu bylo alkalické.

Porovnání měření EIS změřených v 0,9 % NaCl s přídavkem a bez přídavku polysacharidu naznačuje účast hyaluronanu v korozním procesu, což se projevuje zhoršením korozní odolnosti, zejména po delší době ponoření.

Podobně Umoren a spol. nedávno prozkoumali, že některé polysacharidy (pektin, dextran, karboxymethylcelulóza) v 3,5 % roztoku NaCl zvýšily rychlost koroze slitiny AZ31 kvůli komplexaci s ionty hořčíku [48].

Zvýšení koncentrace (molekulové hmotnosti) hyaluronanu vedlo k dalšímu pozorovanému koroznímu chování, což lze vysvětlit fyzikálně-chemickými vlastnostmi hyaluronanu. Podle Yanakiho a Yamaguchiho jsou řetězce kyseliny hyaluronové s molekulovou hmotností vyšší než 1600 kDa zapleteny do síťové struktury, což vede k omezenému transportu molekul polysacharidů [40]. Naproti tomu je hyaluronová kyselina s nižší molekulovou hmotností dispergována v roztoku [49].

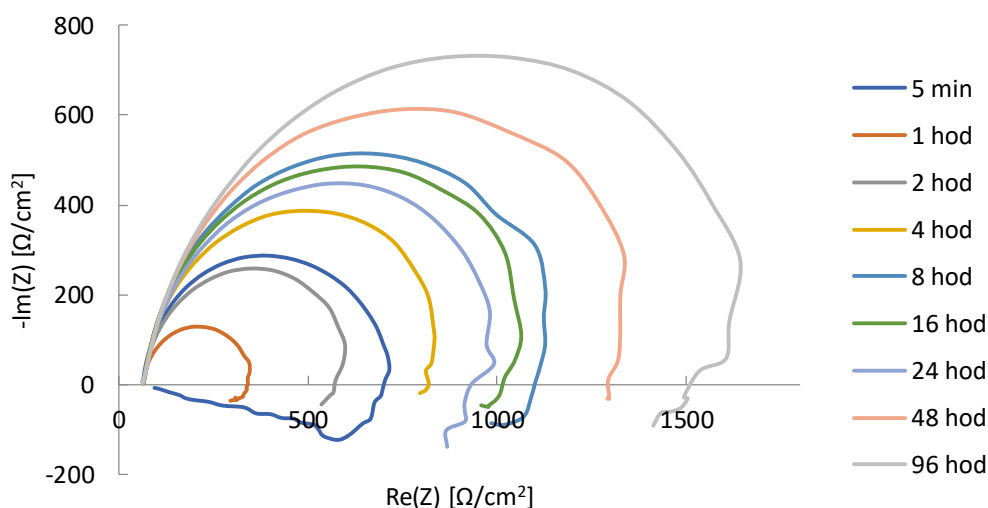
Na základě toho lze předpokládat, že účinek komplexotvorného volného vysokomolekulárního hyaluronanu je omezen při povrchu slitiny. Zapletení řetězců se zvýšilo se vzrůstající koncentrací molekul, což vedlo k mírně nižší rychlosti koroze pozorované při 3 g/l ve srovnání s 0,25 g/l. Tímto způsobem je také možné vysvětlit vyšší hodnoty polarizačního odporu na začátku koroze ve srovnání s 0,9 % roztokem NaCl.



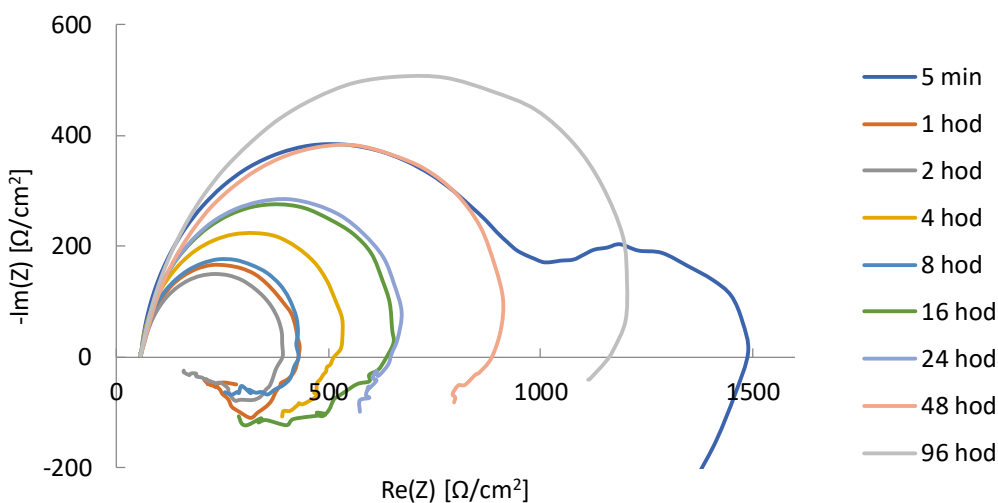
V průběhu času se síťová struktura polymeru poblíž povrchu mohla přeskupit a mohly být k dispozici další volné molekuly ochotné tvořit komplexní sloučeniny. Proto celkově dochází ke komplexaci v menší míře, a tedy koroze AZ31 a účinek hyaluronanu s vysokou molekulovou hmotností je menší v 0,9 % roztoku NaCl.

Zvýšená koncentrace h-HY vedla ke zhoršení korozní odolnosti, protože komplexační interakce byly častější. Ve srovnání s hyaluronanem s nízkou molekulovou hmotností byla v prostředí vysokomolekulárního hyaluronanu pozorována mírně nižší rychlost koroze. To lze vysvětlit interakcemi mezi hyaluronanovými řetězci.

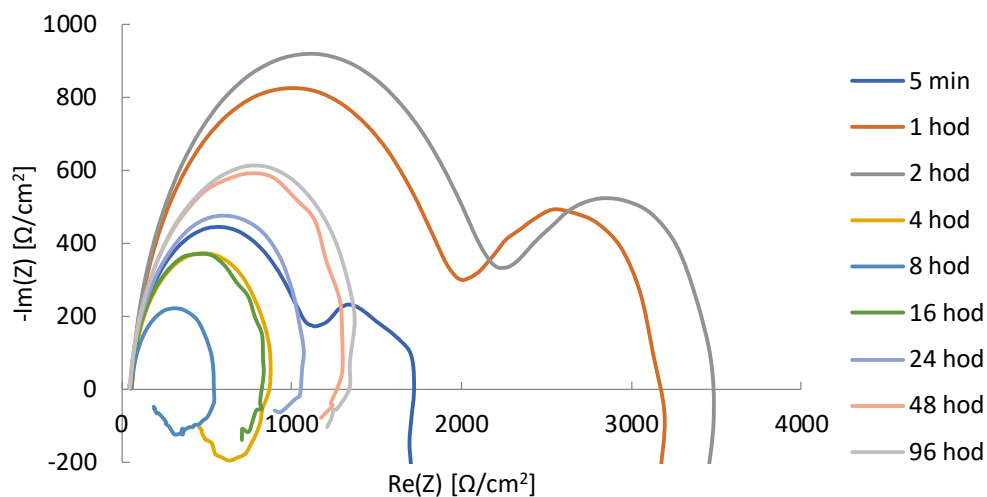
Ve výsledku je transport hyaluronanových komplexů s ionty hořčíku, které se vytvořily kolem povrchu, omezený. Podobně je pohyb molekul hyaluronanu omezen v opačném směru, tj. z roztoku na povrch. Proto dochází ke komplexaci v menší míře a koroze a účinek hyaluronanu s vysokou molekulovou hmotností je menší na korozi AZ31 v 0,9 % roztoku NaCl.



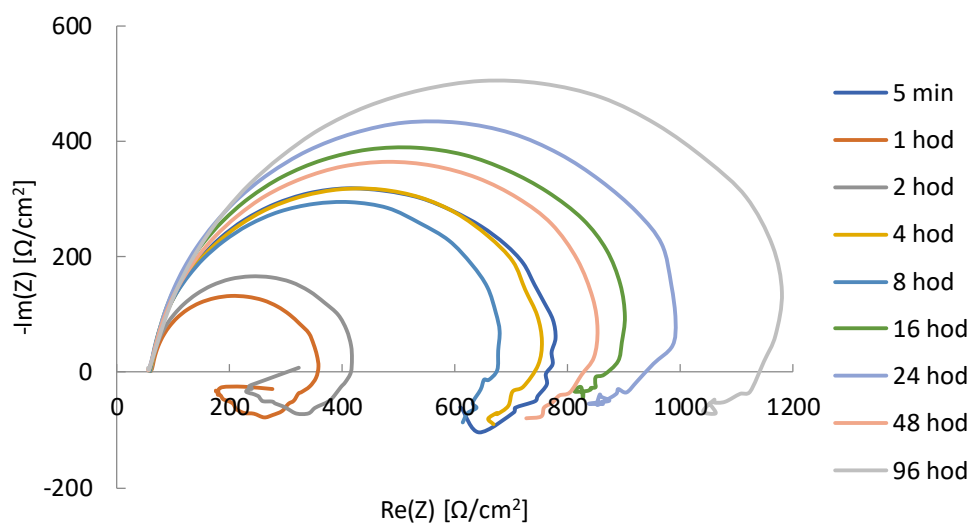
Obrázek 10: Závislost  $-Im(Z)$  na  $Re(Z)$  v roztoku NaCl



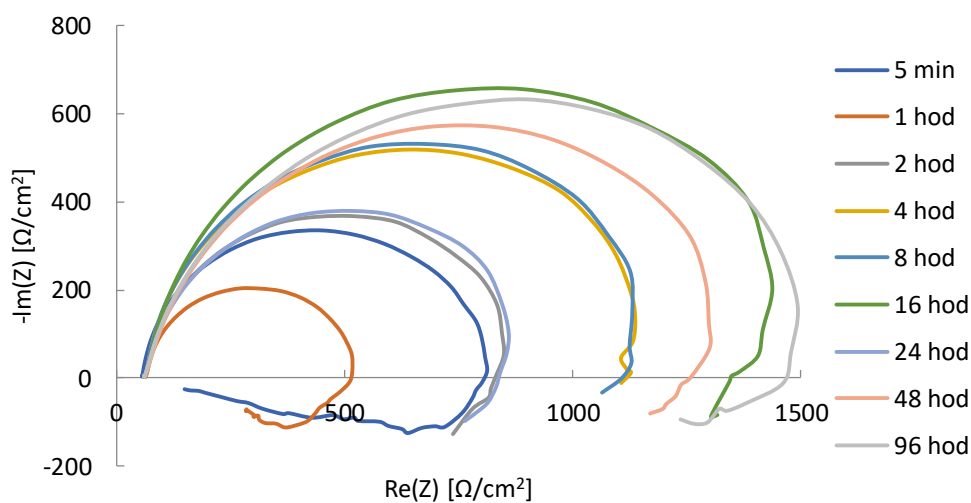
Obrázek 11: Závislost  $-Im(Z)$  na  $Re(Z)$  ( $c = 0,25$  g/l HY,  $M_w = 80-130$  kDa) v roztoku NaCl



Obrázek 12: Závislost  $-\text{Im}(Z)$  na  $\text{Re}(Z)$  ( $c = 3 \text{ g/l HY}$ ,  $M_w = 80\text{--}130 \text{ kDa}$ ) v roztoku  $\text{NaCl}$



Obrázek 13: Závislost  $-\text{Im}(Z)$  na  $\text{Re}(Z)$  ( $c = 0,25 \text{ g/l HY}$ ,  $M_w = 1\,500\text{--}1\,750 \text{ kDa}$ ) v roztoku  $\text{NaCl}$



Obrázek 14: Závislost  $-\text{Im}(Z)$  na  $\text{Re}(Z)$  ( $c = 3 \text{ g/l HY}$ ,  $M_w = 1\,500\text{--}1\,750 \text{ kDa}$ ) v roztoku  $\text{NaCl}$

### 5.2.2 Prostředí SST

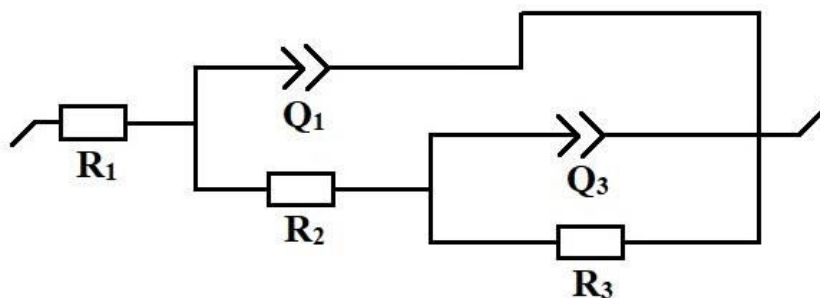
Nyquistovy křivky pro AZ31 v SST s a bez HY mohou být v podstatě popsány dvěma ekvivaletními obvody, které odpovídají modelům C a D (obrázek 15 a obrázek 16). Vypočítané polarizační odpory pro prostředí roztoku SST jsou uvedeny v tabulce 9. Polarizační odpor pro model C (uvedený na obrázku 15) byl vypočten podle rovnice (6):

$$R_p = R_2 + R_3 \quad (6)$$

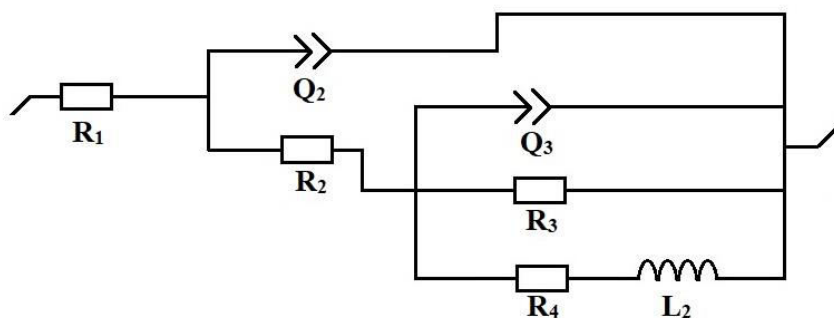
a pro model D (uvedený na obrázku 16) byl polarizační odpor získán podle rovnice (7):

$$R_p = R_2 + \frac{R_3 \cdot R_4}{R_3 + R_4} \quad (7)$$

Pouze v jednom případě byl použit model A, který je blíže charakterizován výše, včetně uvedení rovnice pro výpočet polarizačního odporu  $R_p$ .



Obrázek 15: Schéma použitého obvodu C při měření metodou EIS



Obrázek 16: Schéma použitého obvodu D při měření metodou EIS

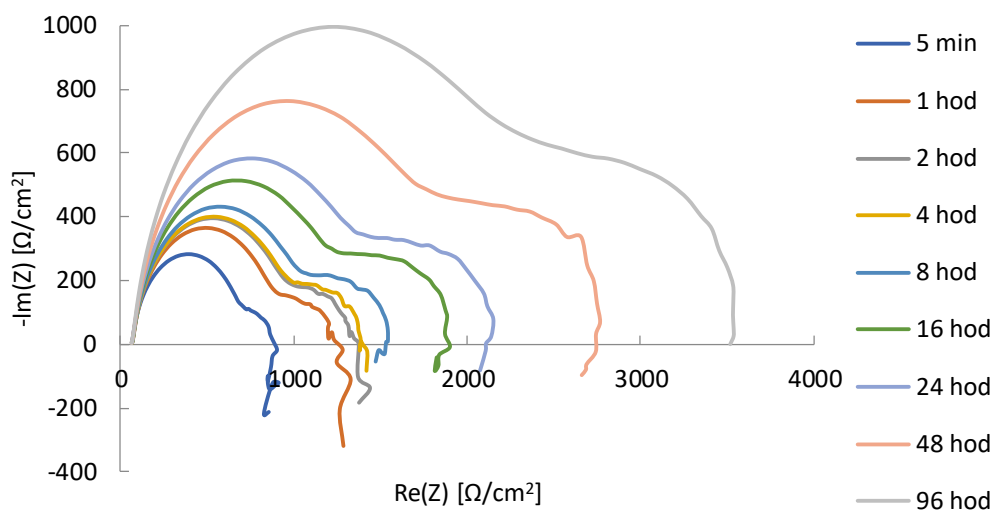
Tabulka 9: Slitina AZ31 v roztoku SST s různými koncentracemi a molekulovými hmotnostmi HY

$M_{wHY}$ [kDa]	-	80–130	80–130	1 500–1 750	1 500–1 750
$c_{HY}$ [g/l]	0	0,25	3	0,25	3
$t$ [hod]	$R_p$ [ $\Omega$ ]				
1/12	796	900	1 016	1 044	2 118
1	1 162	1 222	1 291	1 293	3 570
2	1 269	1 258	1 222	1 291	3 287
4	1 322	1 353	1 274	1 395	3 117
8	1 471	1 462	1 438	1 602	3 305
16	2 015*	1 724	1 712	1 909	4 827
24	2 069*	1 876*	1 926	2 104	5 993
48	2 699*	2 427*	2 576*	2 601	6 137
96	3 518	3 416*	3 324	3 750	2 125**

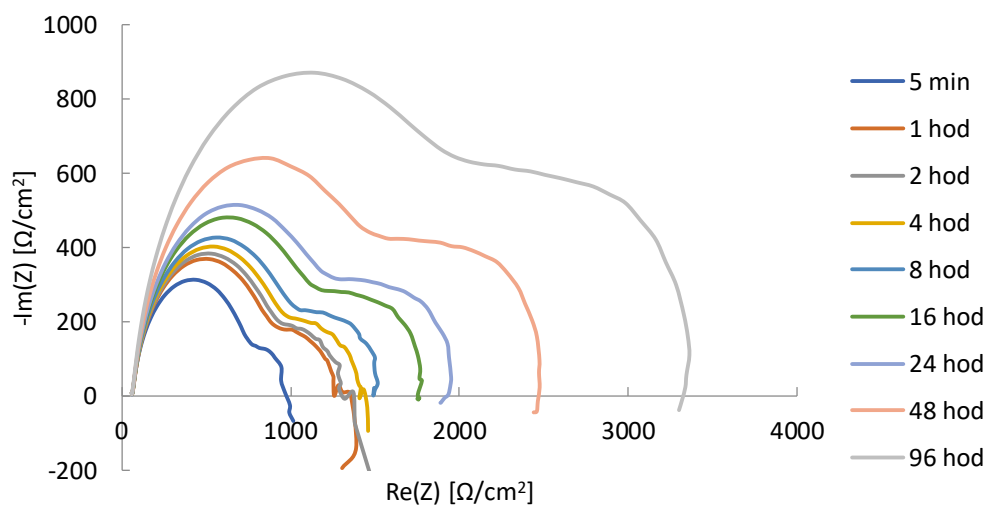
\*u těchto hodnot byl použit pro výpočet  $R_p$  obvod D; \*\*zde byl použit pro výpočet  $R_p$  obvod A; pro všechny ostatní hodnoty  $R_p$  (bez hvězdiček) byl použit obvod C

Model C obsahuje pět prvků, z nichž  $R_s$  je odpor roztoku,  $Q_1$  představuje prvek konstantního fázového posunu korozní vrstvy a  $R_2$  příslušný odpor,  $Q_3$  je prvek konstantního fázového posunu dvojvrstvy na rozhraní slitina AZ31/elektrolyt a  $R_3$  charakterizuje odpor přenosu náboje. Model D navíc obsahuje indukci  $L_4$  a odpor  $R_4$  v sérii, jež indikují bodovou korozi (pitting) nebo adsorpci/desorpci. Nyquistovy křivky a vypočtené polarizační odpory ukazují, že korozní odolnost AZ31 rostla během koroze pro všechna korozní prostředí. V časovém intervalu 1 až 8 h se rychlost koroze měnila minimálně, což může poukazovat na stabilní korozní ochranu. Po osmi hodinách vystavení vzorku koroznímu prostředí se na Nyquistových křivkách objevily také indukční smyčky, avšak vysoký polarizační odpor poukazuje na dominantní ochrannou funkci stále se tvořících korozních produktů.

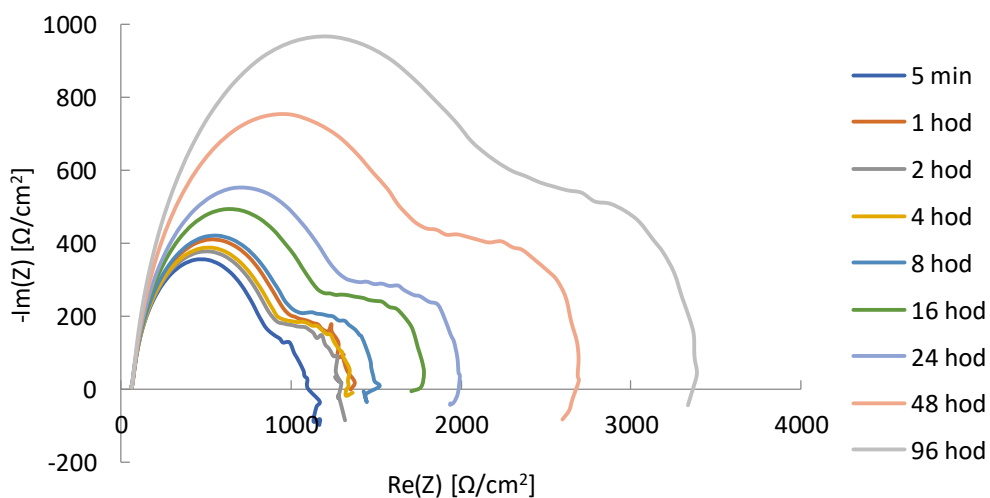
Vliv hyaluronanu na korozi AZ31 v SST byl závislý na koncentraci a molekulové hmotnosti. Nižší koncentrace nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu mírně zhoršily korozi než roztok SST, neboť polysacharid vázal  $Mg^{2+}$  na úkor hydroxidů a fosforečnanů tvořící korozní produkty na AZ31. Vyšší koncentrace nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu měly za následek zlepšení korozní odolnosti AZ31 v porovnání se SST, přičemž efekt vysokomolekulárního polymeru byl markantní. Vytvořené komplexy hyaluronanu s uvolněnými  $Mg^{2+}$  ionty zůstaly "uvězněné" poblíž povrchu kvůli vzájemné interakci řetězců hyaluronanu zpomalující transport jako v předchozím případě. Propletení řetězců bylo výraznější u vysokomolekulárního hyaluronanu, což se odrazilo i na snížení korozní rychlosti.



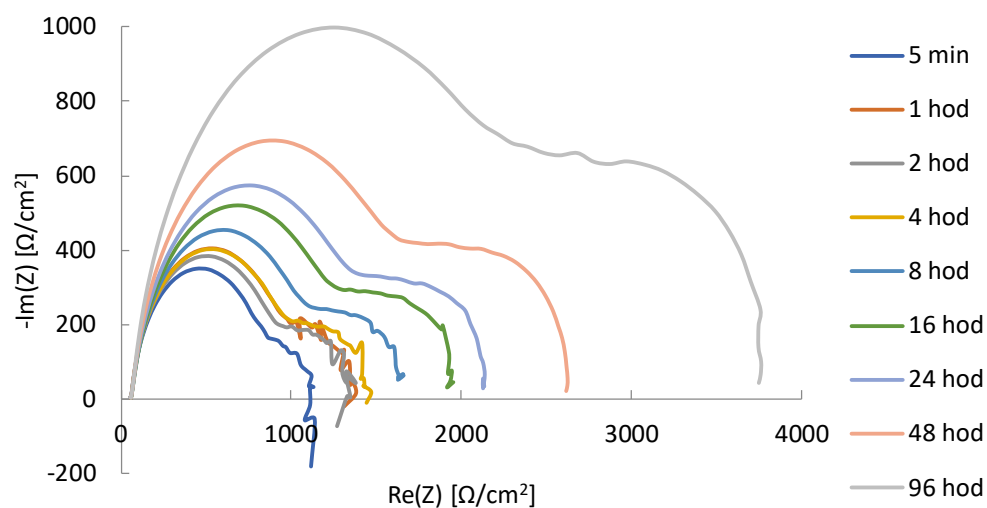
Obrázek 17: Závislost  $-Im(Z)$  na  $Re(Z)$  v roztoku SST



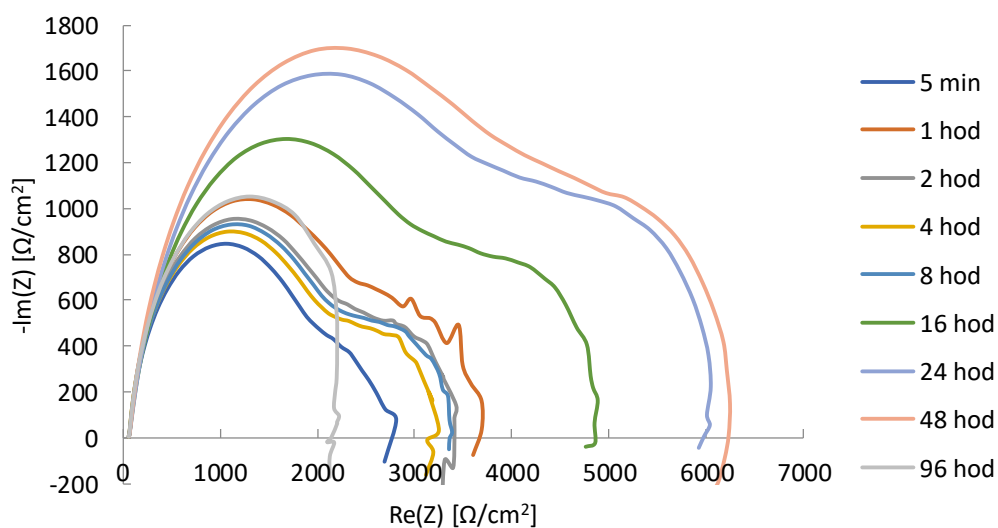
Obrázek 18: Závislost  $-Im(Z)$  na  $Re(Z)$  ( $c = 0,25$  g/l HY,  $M_w = 80-130$  kDa) v roztoku SST



Obrázek 19: Závislost  $-Im(Z)$  na  $Re(Z)$  ( $c = 3$  g/l HY,  $M_w = 80-130$  kDa) v roztoku SST



Obrázek 20: Závislost  $-\text{Im}(Z)$  na  $\text{Re}(Z)$  ( $c = 0,25 \text{ g/l HY}$ ,  $M_w = 1\,500\text{--}1\,750 \text{ kDa}$ ) v roztoku SST

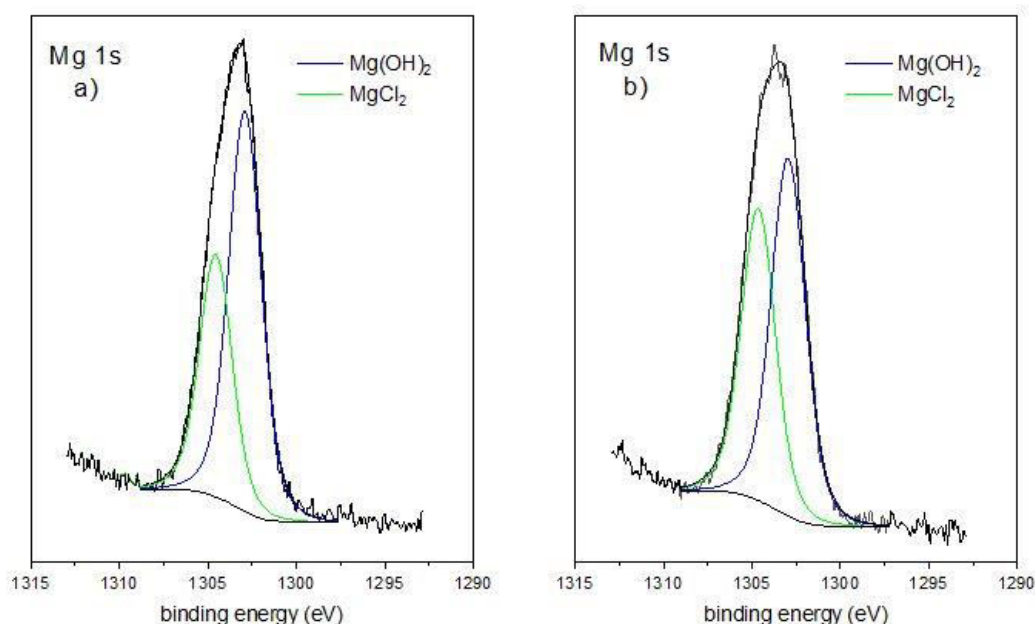


Obrázek 21: Závislost  $-\text{Im}(Z)$  na  $\text{Re}(Z)$  ( $c = 3 \text{ g/l HY}$ ,  $M_w = 1\,500\text{--}1\,750 \text{ kDa}$ ) v roztoku SST

### 5.3 XPS analýza korozních produktů

Chemické složení korozních produktů bylo analyzováno pomocí metody XPS, viz obrázek 22, 23 a 24. Vzorky AZ31 byly korodovány v prostředí NaCl a SST s a bez přidavku 3 g/l hyaluronanu (1 500–1 750 kDa) po dobu jednoho týdne.

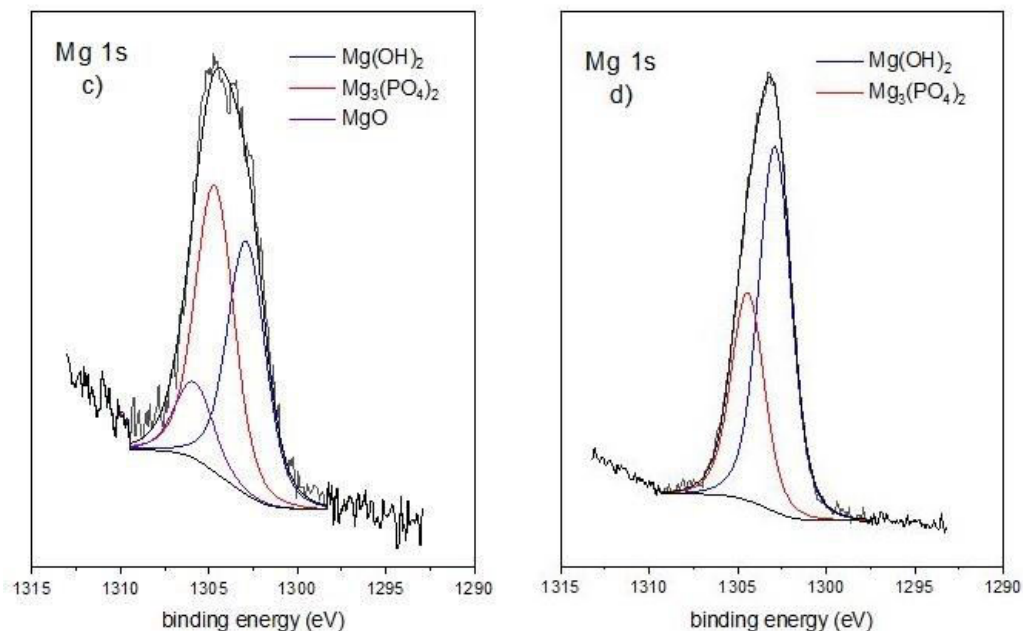
Korozní produkty AZ31 po korozi v NaCl (viz obrázek 22) obsahovaly na svém povrchu převážně hydroxid hořečnatý dle očekávání. Taktéž byla zjištěna přítomnost  $\text{MgCl}_2$ , který se mohl zabudovat do korozních produktů hydroxidu hořečnatého, nebo zůstat na jejich povrchu kvůli nedostatečnému oplachu.  $\text{MgCl}_2$  mohl vzniknout interakcí uvolněných  $\text{Mg}^{2+}$  iontů s chloridy. Stejné složení korozních produktů bylo prokázáno v přítomnosti hyaluronanu. Výsledky také naznačují, že obsah  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  je nižší v přítomnosti hyaluronanu, což je v souladu s předpokladem interakce polymeru s hořečnatými ionty. Analýza XPS nepotvrdila přítomnost adsorbovaných molekul hyaluronanu na povrchu AZ31. Tyto molekuly tedy nemohly ovlivnit korozní chování AZ31 přímou interakcí s povrchem, jak bylo popsáno ve výsledcích EIS.



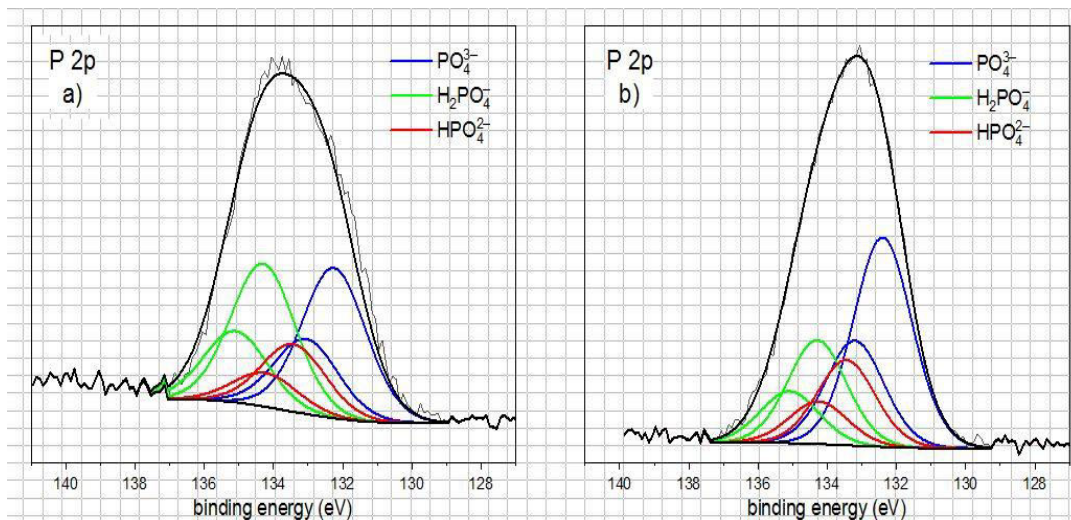
Obrázek 22: XPS spektrum Mg v NaCl a) bez HY, b) s HY

Korozní produkty v prostředí SST ukázaly, že obsahují sloučeniny hořčíku a fosforu (viz obrázek 23 a 24). Hořčík v SST byl vázaný ve formě hydroxidu hořečnatého, fosforečnanu hořečnatého a oxidu hořečnatého.  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  je přirozený korozní produkt hořčíkových materiálů, který byl pozorován také v prostředí 0,9 % NaCl. Fosforečnan hořečnatý vznikl interakcí uvolněných hořečnatých iontů (rozpuštěním slitiny AZ31) s fosforečnany, které se nacházely v roztoku SST. Je potřeba poznamenat, že původní složení SST obsahovalo hydrogenfosforečnany a dihydrogenfosforečnany, které v alkalickém prostředí přechází na fosforečnany. Vytvořený, špatně rozpustný, fosforečnan hořečnatý může přispívat k ochraně AZ31 před korozi. Analýza XPS pro SST s hyaluronanem ukázala, že korozní produkty zahrnují opět hydroxid hořečnatý a fosforečnan hořečnatý, přičemž jejich kvantitativní zastoupení je nižší v porovnání s korozními produkty v prostředí

SST bez hyaluronanu. Fosfor se vyskytuje ve třech vazebných formách: fosforečnan, dihydrogenfosforečnan a hydrogenfosforečnan. Není zřejmé, k jakým kationtům jsou poutané, ale lze předpokládat, že mohou být vázané s  $\text{Mg}^{2+}$  (především fosforečnan, jak vyplývá z XPS pro Mg) nebo s původními kationty ( $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ ) tvořící složení SST před korozí. Ani v případě SST nebyla na povrchu AZ31 pozorována adsorpce hyaluronanu.



Obrázek 23: XPS spektrum Mg v SST c) bez HY, d) s HY



Obrázek 24: XPS spektrum P v SST a) bez HY, b) s HY

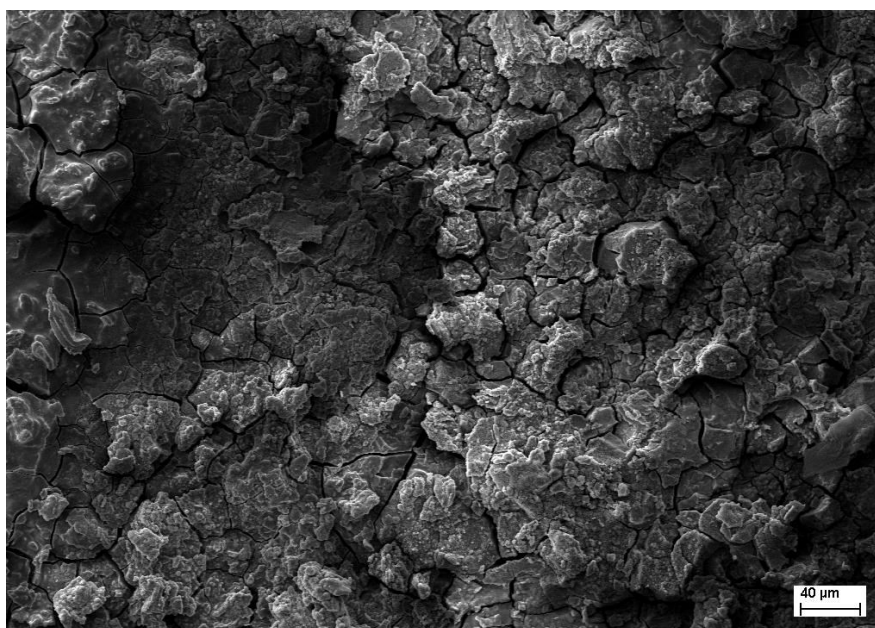


## 5.4 SEM

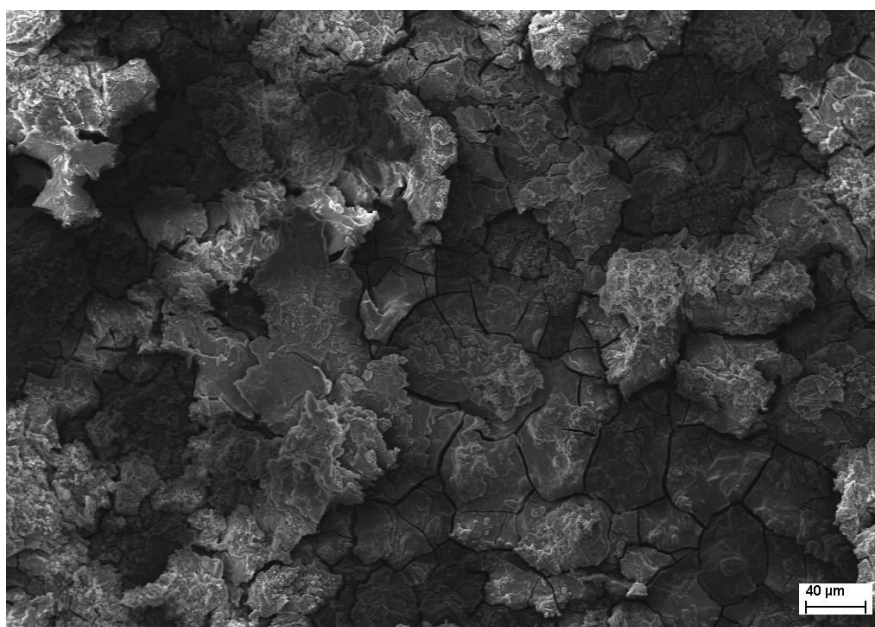
Obrázky 25, 26, 27 a 28 zobrazují morfologii povrchů slitin AZ31 po korozi ve dvou prostředích s a bez hyaluronanu ( $M_w = 1\,500\text{--}1\,700\text{ kDa}$ ,  $c = 3\text{ g/l}$ ).

Všechny fotografie byly pořízeny pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu při zvětšení 500krát.

Slitina AZ31 ponořená v roztoku NaCl, dle obrázku 25 a 26, byla celá pokryta korozními produkty  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ . Základní struktura hořčíkové slitiny nezůstala vůbec odhalena. Tento výsledek byl očekáván na základě EIS výsledků. Povrchová SEM analýza neprokázala dopad na morfologii vlivem hyaluronanu.

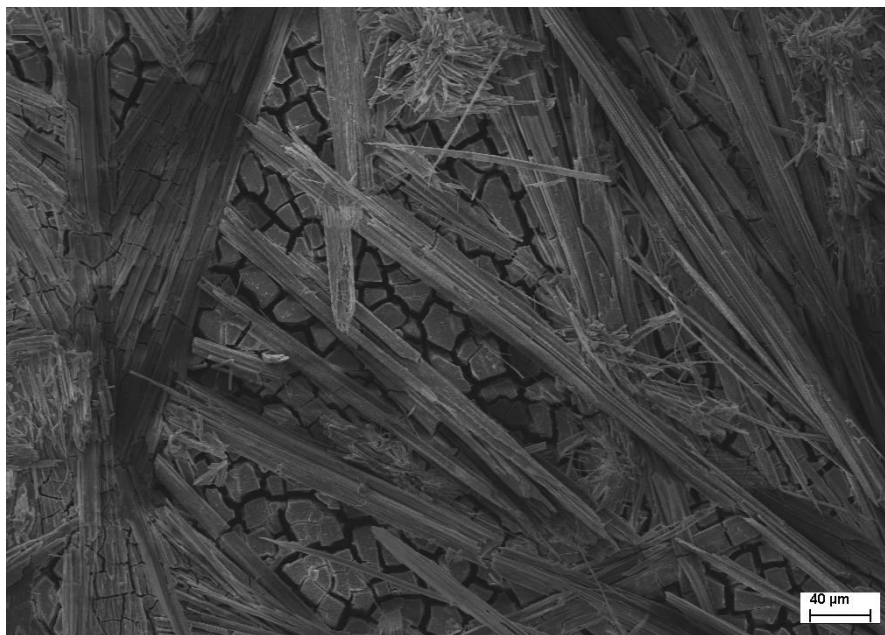


*Obrázek 25: Vzorek slitiny AZ31 v roztoku NaCl*

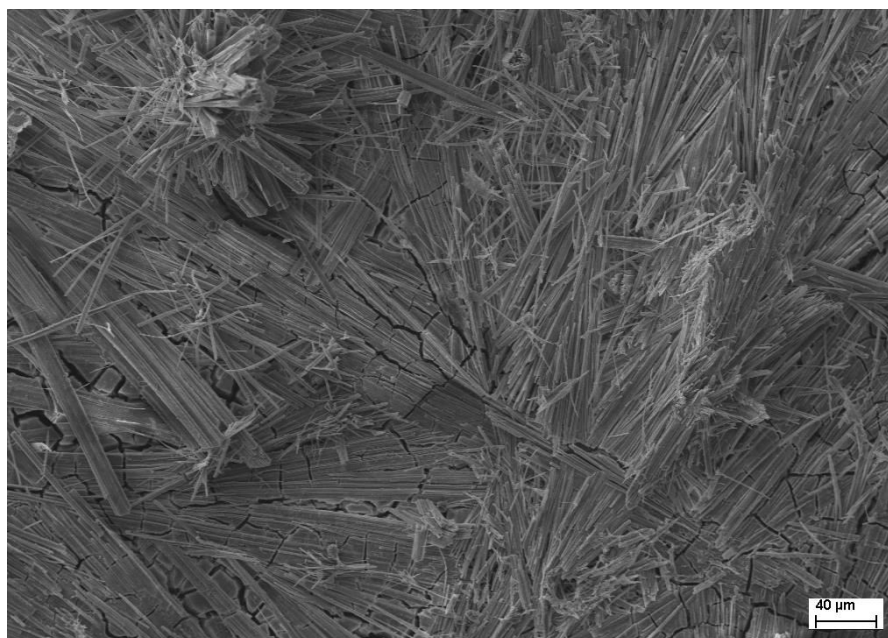


*Obrázek 26: Vzorek slitiny AZ31 v roztoku NaCl s HY*

Obrázky 27 a 28 zobrazují korozní produkty na slitině AZ31 v roztoku SST s a bez hyaluronanu. SEM analýza odhalila, že povrch AZ31 byl tvořený vrstvou  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  (jako v případě NaCl), avšak tento povrch byl navíc pokrytý jehlicovitými krystalky korozních produktů fosforečnanů. Povrchová analýza ukázala, že povrch  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  byl v přítomnosti hyaluronanu mnohem méně pokrytý krystalky fosforečnanů. To může souviset s tím, že hyaluronan přednostně vázal hořečnaté ionty na úkor nerozpustných fosforečnanů. Toto pozorování je ve shodě se závěry z EIS měření.



*Obrázek 27: Vzorek slitiny AZ31 v roztoku SST*



*Obrázek 28: Vzorek slitiny AZ31 v roztoku SST s HY*

## 6 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala vlivem hyaluronanu na korozi hořčíkové slitiny AZ31 ve fyziologických roztocích. K experimentům byla využita potenciodynamická polarizace (PD), elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS), rastrovací elektronový mikroskop (SEM) a rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS).

Z naměřených hodnot PD vyplývá, že v případě přídavku nízkomolekulárního i vysokomolekulárního hyaluronanu do roztoku NaCl byla nejvyšší rychlost koroze slitiny AZ31 při koncentraci 0,25 g/l hyaluronanu. Vyšší koncentrace obou hyaluronanů vedly ke snížení rychlosti koroze.

Metoda PD v roztoku simulované synoviální tekutiny (SST) také odhalila, že dle hodnot  $i_{corr}$  platí nepřímá úměra mezi koncentrací a rychlostí koroze. Nejvyšší rychlost koroze slitiny nastala tedy bez přidání hyaluronanu. To lze potvrdit i grafickým zobrazením polarizačních křivek, které naznačují, že se zvyšující se koncentrací hyaluronanu v SST dochází k mírnému poklesu  $i_{corr}$ , neboli k poklesu rychlosti koroze.

Získaná data metodou EIS byla modelována pomocí příslušných elektrických obvodů. Na základě těchto modelů byly prezentovány pouze hodnoty polarizačních odporů ( $R_p$ ), které jsou mírou rychlosti koroze. Výsledky EIS měření ukázaly, že hyaluronan díky svým specifickým fyzikálně-chemickým vlastnostem významně participuje na korozním chování slitiny AZ31 v prostředí 0,9 % roztoku NaCl a SST.

Průběh koroze metodou EIS po ponoření slitiny AZ31 do 0,9 % roztoku NaCl lze popsat jako konkurenci mezi tvorbou částečně ochranné vrstvy  $Mg(OH)_2$  na povrchu substrátu a rozpuštěním této vrstvy způsobeným hlavně atakem chloridů za vzniku rozpustného  $MgCl_2$ .

Podobné korozní chování bylo pozorováno (dle EIS) u slitiny v roztoku NaCl v přítomnosti 0,25 g/l a 3 g/l hyaluronanu s vysokou molekulovou hmotností. V tomto případě se však na korozi podílely také molekuly hyaluronanu v porovnání s AZ31.

Zvýšená koncentrace vysokomolekulárního hyaluronanu vedla ke zhoršení korozní odolnosti. Porovnání měření EIS v NaCl s přídavkem a bez přídavku hyaluronanu naznačuje jeho účast v korozním procesu, což se projevuje zvýšením korozní rychlosti.

Nyquistovy křivky a vypočtené polarizační odpory slitiny AZ31 naměřené metodou EIS v roztoku SST ukázaly, že korozní odolnost AZ31 rostla během koroze pro všechny koncentrace. Během celého měření se rychlost koroze měnila minimálně. Převládá zde dominantní ochranná funkce stále se tvořících korozních produktů.

Vliv hyaluronanu na korozi AZ31 v SST byl, dle metody EIS, závislý na koncentraci a molekulové hmotnosti. Nižší koncentrace obou hyaluronanů mírně zhoršily rychlost koroze oproti samotnému roztoku SST. Vyšší koncentrace obou hyaluronanů měly za následek zlepšení korozní odolnosti slitiny AZ31 v porovnání se SST. Propletení řetězců bylo výraznější u vysokomolekulárního hyaluronanu, což se odrazilo i na snížení korozní rychlosti.

Závěry získané metodou EIS se liší od výsledků metody PD po přidání hyaluronanu. Tato skutečnost souvisí s rozdílným principem obou metod.

Korozní produkty slitiny AZ31 po týdenní korozi v roztoku NaCl, zjištěné metodou XPS, obsahovaly na svém povrchu převážně hydroxid hořečnatý. Taktéž byla zjištěna přítomnost  $\text{MgCl}_2$ , který mohl vzniknout interakcí uvolněných  $\text{Mg}^{2+}$  iontů s chloridy. Stejné složení korozních produktů bylo prokázáno také v přítomnosti hyaluronanu. Analýza XPS nepotvrdila přítomnost adsorbovaných molekul hyaluronanu na povrchu AZ31. Tyto molekuly tedy nemohly ovlivnit korozní chování AZ31 přímou interakcí s povrchem, jak bylo popsáno ve výsledcích EIS.

Korozní produkty v prostředí SST ukázaly (dle metody XPS), že obsahují sloučeniny hořčíku a fosforu. Hořčík v SST byl vázaný ve formě hydroxidu hořečnatého, fosforečnanu hořečnatého a oxidu hořečnatého. Fosforečnan hořečnatý vznikl interakcí uvolněných hořečnatých iontů (po rozpuštění slitiny AZ31) s fosforečnany, které se nacházely v roztoku SST. Vytvořený fosforečnan hořečnatý může přispívat k ochraně AZ31 před korozi. Ani v případě SST nebyla na povrchu AZ31 pozorována adsorpce hyaluronanu.

Povrchová morfologie zjištěna metodou SEM ukázala, že slitina AZ31 ponořená v roztoku NaCl (s i bez hyaluronanu) byla celá pokryta korozními produkty  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ . Tato analýza také neprokázala dopad na morfologii vlivem hyaluronanu.

Korozní produkty na povrchu slitiny AZ31 v roztoku SST (s i bez hyaluronanu) byly tvořeny vrstvou  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  (jako v případě NaCl), avšak tento povrch byl navíc pokrytý jehlicovitými krystalky korozních produktů fosforečnanů. Povrchová analýza ukázala, že povrch  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  byl v přítomnosti hyaluronanu mnohem méně pokrytý těmito krystalky. To může souviset s tím, že hyaluronan přednostně vázal hořečnaté ionty na úkor nerozpustných fosforečnanů. Toto pozorování je ve shodě se závěry z EIS měření.

Diplomová práce jednoznačně prokázala, že hyaluronan může ovlivnit korozní chování slitiny AZ31 v prostředí 0,9 % NaCl a SST. Efekt hyaluronanu závisí na jeho koncentraci, molární hmotnosti a použitém korozním prostředí.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] JAISWAL, S., A. DUBEY a D. LAHIRI. In Vitro Biodegradation and Biocompatibility of Mg–HA-Based Composites for Orthopaedic Applications: A Review. *Journal of the Indian Institute of Science* [online]. 2019, **99**(3), 303-327 [cit. 2021-01-07]. ISSN 0970-4140. Dostupné z: doi:10.1007/s41745-019-00124-w
- [2] AGARWAL, S., M. RIFFAULT, D. HOEY, B. DUFFY, J. CURTIN a S. JAISWAL. *Biomimetic Hyaluronic Acid-Lysozyme Composite Coating on AZ31 Mg Alloy with Combined Antibacterial and Osteoinductive Activities* [online]. 2017, **3**(12), 3244-3253 [cit. 2021-01-07]. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.7b00527
- [3] XIN, Y., Ch. LIU, X. ZHANG, G. TANG, X. TIAN a P. K. CHU. Corrosion behavior of biomedical AZ91 magnesium alloy in simulated body fluids. *Journal of Materials Research* [online]. 2007, **22**(7), 2004-2011 [cit. 2021-01-07]. ISSN 0884-2914. Dostupné z: doi:10.1557/jmr.2007.0233
- [4] BANSOD, A., N. KHOBRAGADE, K. GIRADKAR a A. PATIL. Effect of concentration of hyaluronic acid and NaCl on corrosion behavior of 316L austenitic stainless steel. *Materials Research Express* [online]. 2017, **4**(11) [cit. 2021-01-07]. ISSN 2053-1591. Dostupné z: doi:10.1088/2053-1591/aa94da
- [5] GEETHA, M., A. K. SINGH, R. ASOKAMANI a A.K. GOGIA. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Progress in Materials Science* [online]. 2009, **54**(3), 397-425 [cit. 2021-03-06]. ISSN 00796425. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmatsci.2008.06.004
- [6] HAN, H., S. LOFFREDO, I. JUN, et al. Current status and outlook on the clinical translation of biodegradable metals. *Materials Today* [online]. 2019, **23**, 57-71 [cit. 2021-01-31]. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/j.mattod.2018.05.018
- [7] FILIP, P.. *Progresivní typy biomateriálů*. Ostrava: VŠB-Technická univerzita, 1995. ISBN 80-707-8273-0.
- [8] MILOŠEV, I., J. HMELJAK a A. CÖR. Hyaluronic acid stimulates the formation of calcium phosphate on CoCrMo alloy in simulated physiological solution. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2013, **24**(3), 555-571 [cit. 2021-01-07]. ISSN 0957-4530. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-012-4827-8

- [9] MITURA, K., P. NIEDZIELSKI, G. BARTOSZ, et al. Interactions between carbon coatings and tissue. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2006, **201**(6), 2117-2123 [cit. 2021-03-06]. ISSN 02578972. Dostupné z: doi:10.1016/j.surfcoat.2005.10.023
- [10] KAMRANI, S. a C. FLECK. Biodegradable magnesium alloys as temporary orthopaedic implants: a review. *BioMetals* [online]. 2019, **32**(2), 185-193 [cit. 2021-01-07]. ISSN 0966-0844. Dostupné z: doi:10.1007/s10534-019-00170-y
- [11] RAHIM, M., S. ULLAH a P. MUELLER. Advances and Challenges of Biodegradable Implant Materials with a Focus on Magnesium-Alloys and Bacterial Infections. *Metals* [online]. 2018, **8**(7) [cit. 2021-04-06]. ISSN 2075-4701. Dostupné z: doi:10.3390/met8070532
- [12] KONVALINKA, J. *Způsoby měření hustoty kostních tkání*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vysoké učení technické. Vedoucí práce Ing. Petr Marcián, Ph.D.
- [13] ESMAILY, M., J.E. SVENSSON, S. FAJARDO, et al. Fundamentals and advances in magnesium alloy corrosion. *Progress in Materials Science* [online]. 2017, **89**(2), 92-193 [cit. 2021-02-05]. ISSN 00796425. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmatsci.2017.04.011
- [14] RIAZ, U., I. SHABIB a W. HAIDER. The current trends of Mg alloys in biomedical applications—A review: a review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2018, **107**(6), 1970-1996 [cit. 2021-01-07]. ISSN 1552-4973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.34290
- [15] ECHEVERRY-RENDON, M., J. P. ALLAIN, S. M. ROBLEDO, F. ECHEVERRIA a M. C. HARMSSEN. Coatings for biodegradable magnesium-based supports for therapy of vascular disease: A general view. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, **102**, 150-163 [cit. 2021-01-07]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.04.032
- [16] LASTRA, M. D., R. PASTELIN, A. CAMACHO, B. MONROY, A.E. AGUILAR, M. LEIST a T. SCHWERDTLE. Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2001, **15**(1), 5-10 [cit. 2021-02-01]. ISSN 0946672X. Dostupné z: doi:10.1016/S0946-672X(01)80019-5
- [17] DRÁPALA, J. *Hořčík, jeho slitiny a binární systémy hořčík - příměs: Magnesium, its alloys and Mg-admixture binary systems*. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita, 2004. ISBN 80-248-0579-0

- [18] GHALI, E. *Corrosion Resistance of Aluminum and Magnesium Alloys* [online]. 2010-03-31 [cit. 2021-03-05]. Dostupné z: doi:10.1002/9780470531778
- [19] AVEDESIAN, M. M. a H. BAKER. *ASM specialty handbook: Magnesium and magnesium alloy*. Materials Park, OH: ASM International, 1999. ISBN 978-087-1706-577.
- [20] FENG, A.H. a Z.Y. MA. Enhanced mechanical properties of Mg–Al–Zn cast alloy via friction stir processing. *Scripta Materialia* [online]. 2007, **56**(5), 397-400 [cit. 2021-02-01]. ISSN 13596462. Dostupné z: doi:10.1016/j.scriptamat.2006.10.035
- [21] YIN, S. M., F. YANG, X. M. YANG, S. D. WU, S. X. LI a G. Y. LI. The role of twinning–detwinning on fatigue fracture morphology of Mg–3%Al–1%Zn alloy. In: *Materials Science and Engineering: A* [online]. 2008, s. 397-400 [cit. 2021-02-01]. ISSN 09215093. Dostupné z: doi:10.1016/j.msea.2008.04.056
- [22] TROJANOVÁ, Z., Z. DROZD, T. ŠKRABAN, et al. Effect of Rotary Swaging on Microstructure and Mechanical Properties of an AZ31 Magnesium Alloy. *Advanced Engineering Materials* [online]. 2019, **22**(1), 397-400 [cit. 2021-02-01]. ISSN 1438-1656. Dostupné z: doi:10.1002/adem.201900596
- [23] ATRENS, A., S. JOHNSTON, Z. SHI, et al. Viewpoint - Understanding Mg corrosion in the body for biodegradable medical implants. *Scripta Materialia* [online]. 2018, 154(2), 92-100 [cit. 2021-02-05]. ISSN 13596462. Dostupné z: doi:10.1016/j.scriptamat.2018.05.021
- [24] GONZALEZ, J., R. Q. HOU, E. P.S. NIDADAVOLU, R. WILLUMEIT-RÖMER a F. FEYERABEND. Magnesium degradation under physiological conditions – Best practice. *Bioactive Materials* [online]. 2018, **3**(2), 174-185 [cit. 2021-04-06]. ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2018.01.003
- [25] HONG, Ch., J. TU, D. LIU, R. LI a Ch. GU. The electrochemical and mechanical properties of Ti incorporated amorphous carbon films in Hanks' solution. *Applied Surface Science*. 2010, roč. 256, č. 16. ISSN 0169-4332.
- [26] MARTIN-ALARCON, L. a T.A. SCHMIDT. Rheological effects of macromolecular interactions in synovial fluid. *Biorheology* [online]. 2016, 53(2), 49-67 [cit. 2021-02-05]. ISSN 18785034. Dostupné z: doi:10.3233/BIR-15104

- [27] MARQUES, M. R. C., R. LOEBENBERG, M. ALMUKAINZI, et al. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technologies* [online]. 2011, 18(3), 15-28 [cit. 2021-02-05]. ISSN 1521298X. Dostupné z: doi:10.14227/DT180311P15
- [28] WAIZY, H., A. WEIZBAUER, Ch. MODREJEWSKI, et al. In vitro corrosion of ZEK100 plates in Hank's Balanced Salt Solution: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *BioMedical Engineering OnLine* [online]. 2012, 11(1) [cit. 2021-04-10]. ISSN 1475-925X. Dostupné z: doi:10.1186/1475-925X-11-12
- [29] MORE, N. S., S. N. PAUL a M. ROY. Electrochemical Corrosion Behaviour of Ti–29Nb–13Ta–4.6Zr Alloy in Physiological Solution Containing Various Synovial Joint Lubricants. *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion* [online]. 2018, 4(3) [cit. 2021-03-29]. ISSN 2198-4220. Dostupné z: doi:10.1007/s40735-018-0156-x
- [30] TKACZ, J., K. SLOUKOVÁ, J. MINDA, J. DRÁBIKOVÁ, S. FINTOVÁ, P. DOLEŽAL a J. WASSERBAUER. Corrosion behavior of wrought magnesium alloys AZ31 and AZ61 in Hank's solution. *Koroze a ochrana materialu* [online]. 2016, 2010-03-31, 60(4), 101-106 [cit. 2021-03-05]. ISSN 1804-1213. Dostupné z: doi:10.1515/kom-2016-0016
- [31] HORYNOVÁ, M. *Únavové chování hořčíkových slitin AZ31 a AZ61 po korozní degradaci: Fatigue behaviour of AZ31 and AZ61 magnesium alloys after corrosion degradation : zkrácená verze Ph.D. Thesis.* [V Brně]: [Vysoké učení technické], [2015]. ISBN 978-80-214-5269-5.
- [32] SLÍVA, J., MINÁRIK, J. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modu-látor imunních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*, 2009, roč. 1, č. 2, s. 75-79.
- [33] COWMAN, M. K., H. LEE, K. L. SCHWERTFEGER, J. B. MCCARTHY a E. A. TURLEY. The Content and Size of Hyaluronan in Biological Fluids and Tissues. *Frontiers in Immunology* [online]. 2015, 6(1), 33-40 [cit. 2021-02-08]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00261
- [34] MARTIN-ALARCON, L., T. A. SCHMIDT, K. GIRADKAR, A. PATIL a E. A. TURLEY. Rheological effects of macromolecular interactions in synovial fluid. *Biorheology* [online]. 2016, 53(2), 49-67 [cit. 2021-02-08]. ISSN 18785034. Dostupné z: doi:10.3233/BIR-15104



- [35] LONGAS, O. M. Hyaluronan in Aging. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, edit. Garg H. and Hales C., Elsevier Ltd., 2004, p. 351-366.
- [36] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinárni Medicína* [online]. 2008, **53**(8), 397-411 [cit. 2021-02-08]. ISSN 03758427. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [37] AGARWAL, S., B. DUFFY, J. CURTIN, S. JAISWAL a E. A. TURLEY. Effect of High- and Low-Molecular-Weight Hyaluronic-Acid-Functionalized-AZ31 Mg and Ti Alloys on Proliferation and Differentiation of Osteoblast Cells. *Biorheology* [online]. 2018, **4**(11), 3874-3884 [cit. 2021-02-08]. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.8b00968
- [38] KARGEROVÁ, A., M. PEKAŘ, K. GIRADKAR, A. PATIL a E. A. TURLEY. Densitometry and ultrasound velocimetry of hyaluronan solutions in water and in sodium chloride solution. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, **106**(11), 453-459 [cit. 2021-02-08]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.01.020
- [39] LAPČÍK, L. Jr., BOHDANECKÝ, M., LAPČÍK, L., BAKOŠ, D. Kyselina hyaluróno-vá – príprava, štruktúra, vlastnosti, aplikácia. *Chemické Listy* 85, 1991, str. 281-299.
- [40] YANAKI, T. a T. YAMAGUCHI. Temporary network formation of hyaluronate under a physiological condition. 1. Molecular-weight dependence. *Biopolymers* [online]. 1990, **30**(3-4), 415-425 [cit. 2021-5-24]. ISSN 0006-3525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.360300319
- [41] ZELLERMANN, A., D. BERGMANN a Ch. MAYER. Cation induced conformation changes in hyaluronate solution. *European Polymer Journal* [online]. 2013, **49**(1), 70-79 [cit. 2021-02-08]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2012.09.025
- [42] FURTH, G., R. KNIERIM, V. BUSS a Ch. MAYER. Binding of bivalent cations by hyaluronate in aqueous solution. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2008, **42**(1), 33-40 [cit. 2021-02-08]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.09.001
- [43] PIRC, E. T., J. ZIDAR a P. BUKOVEC. A Computational Study of Calcium (II) and Copper(II) Ion Binding to the Hyaluronate Molecule. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, **13**(12), 12036-12045 [cit. 2021-5-6]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms130912036

- [44] KIM, Y., Y. JANG, S. KIM, M. LEE, J. CURTIN a S. JAISWAL. Corrigendum to “Functions achieved by the hyaluronic acid derivatives coating and hydroxide film on bio-absorbed Mg” [Appl. Surf. Sci. 473 (2019) 31–39]. *Applied Surface Science* [online]. 2020, **512**(9), 3874-3884 [cit. 2021-02-23]. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2019.145087
- [45] ZHOU, Z., B. ZHENG, H. LANG, A. QIN a J. OU. Corrosion resistance and biocompatibility of polydopamine/hyaluronic acid composite coating on AZ31 magnesium alloy. *Surfaces and Interfaces* [online]. 2020, **20** [cit. 2021-02-23]. ISSN 24680230. Dostupné z: doi:10.1016/j.surfin.2020.100560
- [46] KING, A.D., N. BIRBILIS a J.R. SCULLY. Accurate Electrochemical Measurement of Magnesium Corrosion Rates; a Combined Impedance, Mass-Loss and Hydrogen Collection Study. *Electrochimica Acta* [online]. 2014, **121**, 394-406 [cit. 2021-5-24]. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2013.12.124
- [47] FELIU, S. Electrochemical Impedance Spectroscopy for the Measurement of the Corrosion Rate of Magnesium Alloys: Brief Review and Challenges. *Metals* [online]. 2020, **10**(6) [cit. 2021-5-24]. ISSN 2075-4701. Dostupné z: doi:10.3390/met10060775
- [48] UMOREN, S. A., M. M. SOLOMON, A. MADHANKUMAR a I. B. OBOT. Exploration of natural polymers for use as green corrosion inhibitors for AZ31 magnesium alloy in saline environment. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, **230** [cit. 2021-5-24]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115466
- [49] DOSKOČIL L., M. BUCHTÍK, V. ENEV a J. WASSERBAUER. Effect of high- and low-molecular weight hyaluronan on the corrosion behavior of AZ31 magnesium alloy in the environment of physiological solutions. 2021 (článek v přípravě).

## 8 SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CPE	konstantní fázový posun (constant phase element)
CT	počítačová tomografie (computed tomography)
EDS	energeticky disperzní spektroskopie (energy dispersive spectroscopy)
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
GDOES	optická emisní spektroskopie s výbojem (glow discharge optical emission spectroscopy)
HR	Hankův roztok
HY	hyaluronan
h-HY	vysokomolekulární hyaluronan (high molecular weight-hyaluronan)
l-HY	nízkomolekulární hyaluronan (low molecular weight-hyaluronan)
OCP	potenciál otevřeného obvodu (open circuit potential)
PD	potenciodynamická polarizace
PDA	polydopamin
SCE	nasycená kalomelová elektroda (saturated calomel electrode)
SEM	rastrovací elektronový mikroskop (scanning electron microscope)
SFR	simulovaný fyziologický roztok
SHE	standardní vodíková elektroda (standard hydrogen electrode)
SST	simulovaná synoviální tekutina
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie (X-ray photoelectron spectroscopy)
$\alpha$	koeficient mezi 0 a 1
$C_{HY}$	koncentrace hyaluronanu
$E_{corr}$	korozní potenciál
$E_{we}$	potenciál pracovní elektrody
$i_{corr}$	korozní proudová hustota
$j$	imaginární jednotka
$L$	induktance
$-Im(Z)$	imaginární složka impedance
$\log i$	logaritmus proudové hustoty

$M_{wHY}$	molární hmotnost
$Q$	prvek konstantního fázového posunu v elektrickém obvodu
$R$	odpor
$Re(Z)$	reálná složka impedance
$R_p$	polarizační odpor
$R_s$	odpor roztoku
$\omega$	úhlová frekvence
$Y$	parametr týkající se kapacity
$Z_{CPE}$	impedance konstantního fázového posunu